



HAL
open science

Etude du mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques

Matthieu Mosca

► **To cite this version:**

Matthieu Mosca. Etude du mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Saclay (COMUE), 2018. Français. NNT : 2018SACLS516 . tel-02275803

HAL Id: tel-02275803

<https://theses.hal.science/tel-02275803>

Submitted on 2 Sep 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.

Etude du mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°582 **Cancérologie : Biologie – Médecine – Santé**
Spécialité de doctorat: Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le mercredi 12 décembre 2018, par

Matthieu Mosca

Composition du Jury :

Dr. Laura VELAZQUEZ

CR, Institut André Lwoff/Université Paris XI
(INSERM UMRS-MD1197)

Président

Dr. Isabelle DUSANTER-FOURT

DR2, Institut Cochin

Rapporteur

Dr. Sandra PELLEGRINI

DR1, Institut Pasteur (INSERM U1221)

Rapporteur

Dr. François GIRODON

PU-PH, Université de Bourgogne Franche-Comté

Examineur

Dr. Stéphane PROST

Chercheur, CEA

Examineur

Dr. Isabelle PLO-AZEVEDO

DR2, Gustave Roussy (INSERM U1170)

Directeur de thèse

Dr. Jean-Luc VILLEVAL

DR2, Gustave Roussy (INSERM U1170)

Co-Directeur de thèse

Aux amoureux des Sciences,

A ceux qui Doutent,

Aux insomniaques,

On vit, on parle, on a le ciel et les nuages
Sur la tête ; on se plaît aux livres des vieux sages ;
On lit Virgile et Dante ; on va joyeusement
En voiture publique à quelque endroit charmant,
En riant aux éclats de l'auberge et du gîte ;
Le regard d'une femme en passant vous agite ;
On aime, on est aimé, bonheur qui manque aux rois !
On écoute le chant des oiseaux dans les bois
Le matin, on s'éveille, et toute une famille
Vous embrasse, une mère, une sœur, une fille !
On déjeune en lisant son journal. Tout le jour
On mêle à sa pensée espoir, travail, amour ;
La vie arrive avec ses passions troublées ;
On jette sa parole aux sombres assemblées ;
Devant le but qu'on veut et le sort qui vous prend,
On se sent faible et fort, on est petit et grand ;
On est flot dans la foule, âme dans la tempête ;
Tout vient et passe ; on est en deuil, on est en fête ;
On arrive, on recule, on lutte avec effort...
Puis, le vaste et profond silence de la mort !

11 juillet 1846, en revenant du cimetière.
Tiré du recueil *Les Contemplations*, Victor Hugo (1856).

Remerciements

Il n'y a pas de thèse sans jury de thèse. Je souhaite ainsi tout d'abord remercier Dr. **Laura Velazquez** d'avoir accepté d'être présidente de mon jury de thèse et les Dr. **Stéphane Prost** et Dr. **François Girodon** de m'avoir suivi au cours de mon doctorat et d'avoir accepté d'être mes examinateurs. Bien sûr, un remerciement particulier à mes rapporteurs, Dr. **Sandra Pellegrini** et Dr. Isabelle **Dusanter-Fourt**, pour leur regard critique sur mon travail et leurs corrections détaillées : je ne verrai plus la signalisation de la même manière !

Janvier 2014, L'ex-U1009 m'ouvre les bras. **Isa**, merci de m'avoir permis de faire mon stage de M2 puis ma thèse au sein de l'équipe NMP et d'avoir cru en moi, même si côté financements, la route a souvent été parsemée d'embûches... J'espère que jamais aucun de tes futurs thésards ne battra mon record du nombre de PCR effectuées ! ☺ Et merci à mon co-directeur **Jean-Luc**, et à **Valérie** pour les résultats sur la partie murine. Bientôt la retraite pour toi J-L... Profite ! Tu passeras le bonjour à **Catherine**. Je me souviens encore de mon début de stage lorsque je devais la rejoindre à 7h du mat' pour traiter les souris à l'interféron... Que du bonheur ! **William**, merci pour vos conseils, votre pédagogie et nos conversations scientifiques et non-scientifiques sur l'hématopoïèse, JAK2, la recherche française, et sur la vie. Vos pas discrets à l'entrée d'un bureau et vos « Booon...ça avance ? » me manqueront, l'odeur de vos livarots normands, un peu moins. Vous resterez pour longtemps à mes yeux le pilier de ce laboratoire.

Les jeunes statutaires : **Caro**, merci pour ta bonne humeur quotidienne, ta formation « western » et tes conseils pour garder la salle de bioch' toujours brillante de propreté ! **Iléana**, jeune padawan, bonne chance pour la suite, et tous mes vœux de bonheur, mais tâche de te « délivrer » un autre jour que le 12 décembre !

Les « un-peu-moins-jeunes » statutaires : je sais que tu vas me détester en lisant ces lignes, mais ça fait quand même quelques années que tu as ton poste. **Marie**, je ne sais pas si tu es une vraie bobo mais ça va faire bobo de te quitter (jeu de mots pourri, ok...). Merci d'avoir rendu ces journées plus légères, et merci aussi d'avoir été une oreille attentive : je crois que je dois souvent te désespérer ! Promis, je vais faire un effort pour grandir. **Najet**, et ton humour infailible : gare à ceux qui restent au-delà de 20h au labo, sous peine de se retrouver enfermer dans leur bureau, ou de devoir « fermer toutes les portes »... **Hana**, tu tiens les rênes de l'équipe 2 avec brio. J'ai beaucoup apprécié ton accessibilité et ton sens de l'humour. Courage pour la suite ! **Rahma** et **Paule**, sans qui l'U1170 fonctionnerait très mal, merci à vous pour votre efficacité au quotidien.

Thanks **Rob** for your collaboration and for all the mathematical data you generated. I'm glad to see that our work and all our « Google Hangout » calls have begun to bear fruit. Cheers mate! Je remercie aussi les cliniciens **Eric Solary**, **Bruno Cassinat**, **Jean-Jacques Kiladjian** et **Nicole Casadevall** pour la facilité d'accès aux cellules primaires de patients. **Christophe Marzac**, merci pour ta disponibilité et pour les NGS que tu as réalisés sur la cohorte de patients et merci **Nathalie Droin** pour ton expertise en génomique et pour les analyses de qPCR single cell que tu as générées... grâce à toi, une partie du projet qui me tenait à cœur a pu aboutir !

Philippe, comment ne pas te remercier pour tous ces tris hebdomadaires de CD34, CD38 et CD90 de patients mais aussi et surtout pour les tris qui n'étaient pas prévus : tu disais oui mais ton visage disait non. Désolé vieux, le projet continue, courage ! **Barbara**, je garderai un bon souvenir de nos pauses clopes et de ces apéros punch-caïpi improvisés au gré de ton humeur... très changeante ! J'espère que tout rentrera dans l'ordre pour toi. **Virginie**, j'ai appris à te connaître aux pauses déj' et maintenant je sais que tu n'as aucun scrupule à voler des badges. Merci de m'avoir prêté les moyens techniques d'écrire ces remerciements ! **Mira**, une pensée pour ta peur chronique des chiens, des araignées, et ton goût particulier pour la confection de gâteaux 100% pur beurre. Tu m'as été d'une aide précieuse tout au long de ma thèse et je t'en remercie. Il va falloir arrêter de dire que je ressemble aux « libanais des montagnes » et m'inviter au Liban maintenant ! **Chloés**, je n'ai pas toujours su vous comprendre mais j'ai su vous apprécier. Merci pour tout et bonne chance pour la fin de ta thèse, mais je ne m'inquiète pas de ce côté-là, #non. Une pensée aux bébés PhD's : **Graciela, Camélia, Rameez, Tracy, Francesca, Donia, Christophe**... Courage, mais en vrai ça passe vite ! Merci pour les parties de Secret Hitler et les tours de magie « à la marocaine ». Je remercie aussi les anciens de l'AJC et tous nos projets associatifs, plus ou moins aboutis: **Gaya** et tes saumons au curry, **Lise, Allan, Xénia**... même si cette asso a été un échec –je crois qu'on peut le dire-, c'était quand même enrichissant d'organiser des p'tits déj' pro et des congrès scientifiques !

Merci aussi aux nombreux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer : **Cylia, Fatou, Ludivine, Antoine, Axel** même si t'étais un peu *ché-per*, **Marilyn, Dounia** et **Amandine**. Je ne sais pas à quel point j'ai pu vous être utile, mais une chose est sûre : vous m'avez donné goût à la transmission, merci. **Amandine**, merci infiniment pour ton aide durant tes 6 mois de stage, et pour certaines figures de mon manuscrit. Tu as su me supporter malgré mon stress ambiant, et ce durant ton stage de M1 et de M2, bravo ! Bonne chance pour ta thèse, j'espère vraiment que tu vas éclaircir tout ce bordel entre JAK2 et l'IFN ☺.

Last but not least... **Brahim, khouya**, merci pour tous ces fous rires et ces beaux moments partagés au labo et ailleurs. Promets-moi ~~d'arrêter de~~ de continuer à draguer les femmes enceintes et les cougars... Tu as généré 37 validations de MPL mais tu n'en as pas même besoin d'une seule pour savoir à quel point je t'estime. Fonce, je veux pas des pâtes au basilic mais ton nom en premier auteur sur *Nature* ! **Stef, Ale**. J'écris vos deux noms ensemble, d'abord parce que vous êtes tous les deux ritals et que je suis un putain de raciste –c'est *dommagio*-, mais aussi parce qu'on est arrivés ensemble et qu'on va repartir ensemble. Je n'aurais pas pu rêver meilleurs coéquipiers. On se fait une pizza à l'ananas quand vous voulez, mais de préférence très vite, et à Stockholm.

Un grand merci à toute l'équipe de la Cité des Sciences qui m'a permis de prendre part aux projets de médiation et de vulgarisation scientifique pendant deux ans. Ce contact avec le public fut une activité très enrichissante. Une pensée particulière à ma tutrice **Isabelle**, à **Gilles, Mathieu**, ainsi qu'à **Valérie** et **Marlène** pour leur bonne humeur et pour le travail de longue haleine qu'on a mené sur la médecine au Moyen-Âge. Merci de m'avoir donné l'opportunité de gérer pas mal d'animations : Darwin, le bar à plantes, le réchauffement climatique, mais aussi d'avoir pu présenter ma thèse vulgarisée devant un public divers. Merci à la dessinatrice **Tatienne** et ses magnifiques croquis de doctorants pris en flag' de vulgarisation de leur thèse. Merci

aussi à **Isabelle Bousquet-Maniguet** et à toute l'équipe de tournage de m'avoir permis de raconter mon pire et mon meilleur souvenir de thèse dans un petit court métrage. Je garderai un très bon souvenir de ces années auprès de vous.

Les années fac et les potes du magistère : **Djidji, Joy, Babs** alias les originals de la New Orleans, mais aussi **Maria, Roberta, Sim', Juliane, David, Isma, Marine, Lisa...** On ne se voit plus aussi souvent qu'avant mais ces années resteront pour moi synonyme de voyages et de découvertes, mais aussi de grosses soirées #WEI #GermanWings. Les US avec vous me manquent ! On se faisait vraiment des couilles à l'époque. Bon, et je vais tâcher d'arrêter de vendre la peau de l'ours avant de l'avoir achetée, mais je suis pas un mec alpha, vous savez bien.

Et puis il y a le groupe Eté, les potos de l'ancienne, nos vacances annuelles aux quatre coins de la France, nos tournois endiablés jusqu'au bout de la nuit pour la coupe du monde de Beer Pong, et nos randos vélos (#PlansGalère) qui nous poussent à casser des anti-vols à la main, à emprunter des nationales et à gravir le pont de Saint-Nazaire alors qu'on y était pas vraiment préparés. Mes bros **Georgette** et **Valoche** pour toutes les dingeries qu'on a pu faire, les papis vodka, les bières un peu trop chaudes, l'EVG à Budapest et toutes les photos qu'il faudra peut-être un jour supprimer... ou faire ressortir ? ☺ J'ai été fier d'être témoin de ton mariage. **Romain**, parce que sans toi on aurait jamais pu finir en finale... **Maïmou**, pour les apéros à l'appart et les discussions improbables sur les vêtements avec le coloc et sa névrose pour les vêtements de nuit, les T-shirt et les polos, sans oublier **Souf**, les **Mathilde, Cams, Clo, Caro, Jojo, A-M, Elina** (j'attends toujours le repas que tu m'as promis, je désespère de te revoir un jour...), **Morgan, Anne** et le petit **Mieszko** (faudra peut-être se mettre d'accord sur l'orthographe, c'est pas facile...!).

Une petite pensée à mes potes d'enfance qui m'ont aussi permis de me forger. **Jerem, Antho, Cyril, Eva...** et **Marina**, même si on se voit plus souvent, c'est toujours pareil quand on se retrouve ! Merci de nous avoir hébergé à Brighton et de m'avoir fait découvrir la culture anglaise du thé.

Je dédie aussi ce travail aux « cassos de l'amour ». **Alex**, on s'est connus à la fac et on est vraiment devenus amis à force de se chercher dans les couloirs de Gustave. Merci pour ta présence au quotidien pendant ces 5 années, pour ta patience le midi alors qu'on avait prévu de manger ensemble, et pour ta rando vélo sur l'île de Porquerolles qui était vraiment très paisible et agréable. Fini les soirées où on se la colle comme avant que tu partes en congrès à Liverpool, maintenant on soulève de la fonte et on brûle de l'ATP ensemble lôô. T'es un fragile, mais t'es un vrai. Du love sur toi, petite suédoise. J'espère que tu trouveras vite un post-doc. **Hélène**, alias « *needy* », ça fait maintenant plus de 10 ans qu'on se connaît. On buvait des bières *lasse-deg* sur les bancs près du Père-Lachaise, maintenant on fait des dégustations à l'aveugle des meilleurs cépages français (c'est pas gagné pour toi, mais courage...!). Pourtant, rien n'a changé : merci pour ton écoute, ton calme et ta générosité, tu es quelqu'un d'exceptionnel. Je garde un souvenir inoubliable de nos balades sur le bord de l'Ourcq, de mes crevaisons incessantes, de la Loire à Vélo, du camping sauvage sur le Preikstolen où j'ai réussi à te faire laver mes caleçons, du faux coucher de soleil aux îles Lofoten, du road trip dans les Balkans et plus globalement de ta fragilité (...intestinale. Vive matin léger de Lactel !). Un souvenir plus amer toutefois lorsque tu as dévoré mon pain aux framboises pendant que je

me baignais à Sveti Stefan. Là, je dis pas merci. **Will**, @PèreCastor, t'es comme mon *re-frère*, c'est toi que je vois dans le reflet. Bon, j'arrête ma prose pourrie. Hier, c'était la rentrée de CE2 et aujourd'hui, on est à l'aube de la trentaine et colocs dans le 14. Je compte même plus les années. Merci pour ton soutien, ton intérêt large pour tous les domaines de connaissance, y compris les western (« il est dyslexique le mec qui a écrit Falcon au lieu de flacon ? »). Père Castor, tous les soirs est une nouvelle histoire avec toi : merci pour tes anecdotes croustillantes sur les Deux Guerres, va falloir vraiment songer à lancer une appli. Je pensais jamais dire ça un jour, mais merci aussi pour les odeurs d'épices et d'ail qui émanent souvent, ça rend l'appart finalement plus vivant. *Is there a videogag somewhere ?* Non, tu sais déjà tout. Bonne chance pour Air France et ton brevet de pilote, t'as intérêt à cartonner !

Et puis, il y a les fondations : un grand merci à ma famille, mes oncles, mes tantes en France et en Italie. Une pensée particulière à mes cousins **François** et **Clélia**, notre voyage mythique en Egypte il y a 15 ans et toutes les péripéties... HIBISCUS !!!! Merci d'avoir toujours été là. **Cathy**, je te réserve une copie de ma thèse pour quand tu seras grande. Il paraît que tu as le sommeil léger, ça ne peut qu'aider...

A mes parents, sans qui, physiquement, ce travail n'aurait jamais pu être possible et surtout merci à toi **maman**, de m'avoir toujours poussé à poursuivre des études et de m'avoir soutenu dans mes choix. J'espère que tu es fière. A tous ceux qui sont partis, trop tôt.

Pour finir, je voudrais remercier le *Chill*, particulièrement **Jasmine Thompson**, **Fakear**, et **Clément Bazin** de m'avoir accompagné tout au long de ma thèse. Vos musiques enivrantes ont rendu mon quotidien moins morose, et vous avez su m'apaiser les jours de grand stress, surtout pendant l'écriture du manuscrit. Merci aussi à ma cigarette électronique. Goût Cassis-Mangue, ça vaut pas les bonnes vieilles *Gauloises*, mais on s'y fait...

Merci. Merci. Merci, Merci.

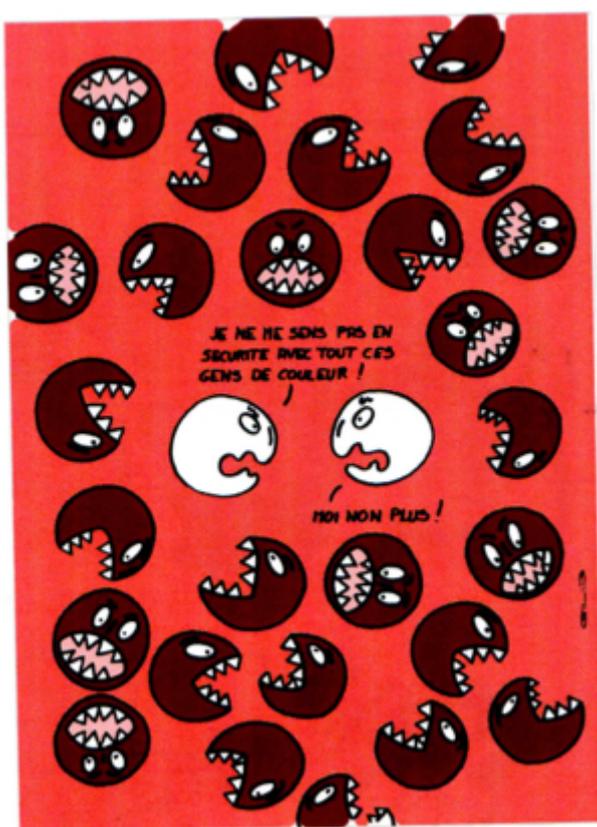


Illustration tirée de "*Drôle de Santé !*", Gilles Labryère, Juillet 2017.

Table des matières

Table des matières	1
Abréviations	4
Résumé	9
Abstract	10
Etat de l'Art	11
Chapitre I. Introduction à l'Hématopoïèse	11
1.1 Définitions	11
1.2 Description et caractérisation de la hiérarchie hématopoïétique	13
1.3 Destin et engagement cellulaire: théories et modèles	17
1.4 Régulation de l'hématopoïèse: homéostasie et microenvironnement	19
Chapitre 2. Les néoplasmes myéloprolifératifs	22
2.1 Les néoplasmes myéloïdes	22
2.2 Historique et classification des maladies myéloprolifératives	23
2.3 Les anomalies moléculaires touchant les tyrosines kinases dans les NMP : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique	25
2.4 Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques et négatifs pour BCR-ABL	26
2.4.1 Les principales caractéristiques cliniques	26
2.4.1.1 La Thrombocytémie Essentielle (TE)	26
2.4.1.2 La Polyglobulie de Vaquez (PV)	27
2.4.1.3 La Myélofibrose Primaire (MFP)	28
2.4.2 Les principales caractéristiques moléculaires	30
2.4.2.1 Des facteurs moléculaires communs	30
2.4.2.1.1 Les mutants JAK2 : JAK2 ^{V617F} et les mutations de l'exon 12 de JAK2	30
2.4.2.1.2 Les mutants MPL	32
2.4.2.1.3 Les mutants CALR	33
2.4.2.2 Des maladies acquises et clonales de la CSH	35
2.4.2.3 Une hyperprolifération des lignages myéloïdes	36
2.4.2.4 Les modèles murins	37
2.4.2.5 Trois maladies, trois anomalies génétiques, un continuum ?	40
2.4.3 Les autres mutations associées	41
2.4.3.1 Les mutations impactant des voies de signalisation	42
2.4.3.2 Les facteurs de régulation épigénétique	44
2.4.3.3 Les gènes de la machinerie de l'épissage	47
2.4.3.4 Les facteurs de transcription impliqués dans la leucémogénèse	47
Chapitre 3: Des protéines mutantes impliquées dans la voie JAK2/STAT	49

3.1 Propriétés générales de JAK2	49
3.1.1 Domaines de JAK2 et interaction aux récepteurs de cytokines.....	49
3.1.2 L'exemple du complexe TPO/MPL	52
3.1.3 Régulation et rétrocontrôle négatif de la signalisation JAK2/STAT	54
3.1.4 Contexte pathologique et activation constitutive de JAK2	55
3.1.5 La protéine JAK2 ^{V617F} et ses effets sur la signalisation	57
3.1.5.1 Impact de JAK2 ^{V617F} sur la voie JAK2/STAT	57
3.1.5.2 Impact de JAK2 ^{V617F} sur la voie PI3K-AKT	61
3.1.5.3 Impact de JAK2 ^{V617F} sur la voie des MAPK.....	62
3.1.6 Fonction et localisation nucléaire de JAK2 ?	63
3.1.7 Fonction chaperonne de JAK2	65
3.1.8 JAK2 ^{V617F} et les théories mécanistiques de pléiotropie phénotypique.....	65
3.1.8.1 Le dosage génique	66
3.1.8.2 Le différentiel de signalisation des STATs	67
3.1.8.3 Les variations génotypiques liées à l'individu	68
3.1.8.4 Des évènements antérieurs et postérieurs à JAK2 ^{V617F}	68
3.2. Propriétés générales de CALR	71
3.2.1 CALR, une protéine du réticulum endoplasmique (RE).....	71
3.2.2 Fonctions de la CALR.....	72
3.2.3 Domaines de la CALR	74
3.2.4 Les mutants CALR et leur implication dans les NMP	75
3.2.5 Modèles d'action des mutants CALR dans les NMP	77
3.2.5.1 Interaction persistante avec MPL	77
3.2.5.2 Perturbation de la signalisation calcique	78
3.2.5.3 Action sécrétrice de la protéine	79
3.2.5.4 Un marqueur clé de la phagocytose	79
Chapitre 4. Les traitements dans les NMP classiques	80
4.1 Les approches thérapeutiques conventionnelles.....	80
4.1.1 La Thrombocytémie Essentielle (TE).....	80
4.1.2 La Polyglobulie de Vaquez (PV)	82
4.1.3 La Myélofibrose Primaire (MFP)	82
4.2 Les principaux inhibiteurs de JAKs.....	83
4.2.1 Le ruxolitinib ou JAKAVI (INCB018424)	84
4.2.2 Le fedratinib (SAR302503 ou TG101348)	85
4.2.3 Le momelotinib (CYT387 ou GS0387).....	85
4.2.4 Le gandotinib (LY2784544)	86
4.2.5 Le pacritinib (SB1518)	86

4.2.6 Le BMS-911543	86
4.3 Les inhibiteurs d'HDAC	87
4.4 Les inhibiteurs des HSP	88
4.5 L'interferon	89
4.5.1 Découverte de l'IFN de type I	89
4.5.2 Généralités et voies de signalisation des IFNs	90
4.5.3 Les ISGs, des médiateurs phares de l'IFN de type I	92
4.5.3.1 Sensibilisation à l'IFN de type I	92
4.5.3.2 Désensibilisation à l'IFN de type I	93
4.5.4 Les activités biologiques de l'IFN α	95
4.5.4.1 L'IFN α , une molécule immunomodulatrice	95
4.5.4.2 L'IFN α , une molécule anti-angiogénique	96
4.5.4.3 L'IFN α , une molécule impactant le cycle cellulaire	96
4.5.4.4 L'IFN α , une molécule pro-apoptotique	99
4.5.5 L'IFN α dans le traitement des NMP	100
Revue	103
Objectifs	117
Résultats	118
Partie 1. Etude de l'effet de l'IFN α sur les différents compartiments hématopoïétiques de patients traités in vivo et atteints de NMP JAK2 ^{V617F} CALR ^{mut} ou MPL ^{mut}	118
Partie 2. Etude des interrelations entre la signalisation induite par JAK2 et celle de l'IFN α dans les cellules primaires de patients et dans les lignées murines	158
Partie 3. Etude des interrelations entre la signalisation induite par JAK2 et celle de l'IFN α dans le modèle in vivo de souris KI JAK2 ^{V617F}	182
Discussion	193
Références	206
Annexes	220

Abréviations

AAS : acide acétylsalicylique
ABL1 : Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AGM : aorte-gonade-mésonephros
AKT : protéine kinase B
ALK-2 : activin receptor-like kinase-2
ALR : AIM2-like receptors
ARNm : acide ribonucléique messenger
ASXL1 : additional sex combs like 1
ATP : adénosine triphosphate
BAD : Bcl-2-associated death promoter
BAP1 : BRCA1 associated protein-1
BAX : Bcl-2-associated X protein
BCL-XL : B-cell lymphoma-extra large
BCL-2 : B-cell lymphoma 2
BFGF : basic fibroblast growth factor
BFU-E : burst forming unit – érythroïde
BCR-ABL : breakpoint cluster region - Abelson
CALR : calréticuline
CBF : core binding factor
CBL : casitas B-cell lymphoma
CCNB2 : G2/mitotic-specific cyclin-B2
CD : cluster de différenciation
CDC : cell division cycle
CDK : cyclin-dependent kinase
CEE : colonie endogène érythroïde
CEM : colonie endogène mégacaryocytaire
CFU : colony forming unit
CFU-B/mast : colony forming unit – basophile mastocytaire
CFU-E : colony forming unit – érythroïde
CFU-Eo : colony forming unit – éosinophile
CFU-GEMM : colony forming unit – granulocyte érythrocyte macrophage mégacaryocyte
CFU-GM : colony forming unit – granulo-monocytaire
CFU-MK : colony forming unit – mégacaryocytaire
CFU-S : colony forming unit - spleen
CFC : colony forming cell
CHIP : immunoprécipitation de chromatine
CIS : cytokine inducible SH2-containing protein
CLP : progéniteur lymphoïde commun
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité
CMN : cellule mononucléée
CMP : progéniteur myéloïde commun
CNX : calnexine
COMFORT : controlled myelofibrosis study with oral JAK inhibitor treatment
CPSH : cellule progénitrice et souche hématopoïétique
CRISPR : clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CRKL : Crk-like protein
CSC : cellule souche cancéreuse
CSF : colony stimulating factor
CSF3R : colony stimulating factor 3 receptor
CSH : cellule souche hématopoïétique
CXCL : Chemokine (C-X-C motif) ligand
DAP : death-activating protein
DGS : syndrome de Di Guglielmo
DNMT3A : DNA methyltransferase 3A
EMA : agence européenne du médicament
Ep : précurseur érythroïde
EPO : érythropoïétine
EPOR : récepteur à l'érythropoïétine
ERAD : ER-associated degradation pathway
ERK : mitogen activated kinase kinase kinase
ERp57 : p57 endoplasmic reticulum oxydoreductase
ETS : E26 transformation-specific
ETV6 : translocation-Ets-leukemia virus 6
EZH1/2 : enhancer of zeste homolog 1/2
FDA : agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FERM : 4.1 protein ezrin radixin moesin
FGFR : fibroblast growth factor receptor
FLI1 : Friend leukemia integration 1 transcription factor
FLT3 : fms-like tyrosine kinase 3
GAB2 : GRB2-associated-binding protein 2
GAF : interferon gamma activation factor
GAS : gamma-activated sequence
GATA-1 : GATA-binding factor 1
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
G-CSFR : récepteur au granulocyte colony stimulating factor
GHR : growth hormone protein
GMP : progéniteur granulo-monocytaire
GM-CSF : granulocyte monocyte colony stimulating factor
GRB2 : growth receptor bound protein 2
HDAC : histone désacétylase
HEL : human erythroid leukemia
HLA : human leukocyte antigen
HP-1 α : heterochromatin protein 1 alpha
HSP : heat shock protein
HTATIP : Histone acetyltransferase KAT5
HU : hydroxyurée
H3K27me3 : triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3
IDH1/2 : isocitrate dehydrogenase 1/2
ID1 : DNA-binding protein inhibitor
IFI : gamma-interferon-inducible protein
IFIT : interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats
IFITM : interferon-inducible transmembrane
IFN : interféron
IFNAR : récepteur de l'interféron de type I
IFNGR : récepteur de l'interféron de type II

IFNLR : récepteur de l'interféron de type III
IGF : insulin-like growth factor
IKZF1 : ikaros family zinc finger protein 1
IL : interleukine
IL-10R2 : récepteur de l'interleukine 10
INSP3R : Inositol-1,4,5-trisphosphate
IPSC : induced pluripotent stem cell
IRF : interferon regulatory factor
ISG : interferon-stimulated gene
ISGF3 : interferon-stimulated gene factor 3
ISRE : interferon-stimulated response element
I κ B : inhibiteur de NF- κ B
JAK : janus kinase
JH : JAK homology
KDEL : motif lysine aspartate glutamate leucine
KDR : kinase insert domain receptor
KI : knock in
KIT : proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KO : knock out
KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAM : leucémie aigüe myéloïde
LB : lymphocyte B
LEC : leucémie à éosinophiles chronique
Lin : lignage
LLA : leucémie lymphoïde aigüe
LLC-B : leucémie lymphoblastique B chronique
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
LMO2 : LIM domain only 2
LNC : leucémie à neutrophiles chronique
LNK : lymphocyte specific adapter protein
LOH : loss of heterozygosity
LSK : Lin⁻Sca-1⁺Kit⁻
LT : lymphocyte T
LTC-IC : long term culture – initiating cell
LT-CSH : cellule souche hématopoïétique à long terme
MAFG : musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog G
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MAVS : mitochondrial antiviral-signaling protein
M-CSF : macrophage colony stimulating factor
MDM2/4 : murine double minute 2/4
MEK : mitogen activated kinase kinase
MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire
MEP50 : Methylosome protein 50
MFP : myélofibrose primaire
MIP : macrophage inflammatory protein
MIG : Monokine induced by interferon gamma
Mkp : précurseur mégacaryocytaire
MLP : progéniteur myélo-lymphoïde
MNK-1 : MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1

MPL : myeloproliferative leukemia virus
MPP : progéniteur multipotent
MSC : cellule souche mésenchymateuse
MTOR : mechanistic target of rapamycin
MX : myxovirus resistance
NAC : N-acétylcystéine
NGS : next generation sequencing
NF-κB : nuclear factor-kappa B
NF1 : neurofibromine 1
NK : cellule tueuse naturelle
NM : néoplasme myéloïde
NMP : néoplasme myéloprolifératif
NOD : non-obese diabetic
NOXA : Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein
NRAS : Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
OAS : 2'-5'-oligoadenylate synthétase
OMS : organisation mondiale de la santé
PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes
PCR : polymerase chain reaction
PDGFR : platelet derived growth factor receptor
PDI : protéine disulfure isomérase
Ph : chromosome de Philadelphie
PIAS : protéine inhibitrice de STAT
PIM : Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
PIP3 : phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PI3K : phosphoinositide 3 kinase
PKR : protéine kinase R
PLP : progéniteur lymphoïde précoce
PML : acute promyelocytic leukemia
PRC 1/2 : polycomb repressive complex 1/2
PREM : progéniteur de repopulation érythro-mégacaryocytaire
PRMC : progéniteur de repopulation myéloïde commun
PRMk : progéniteur de repopulation mégacaryocytaire
PRMT5 : Protein arginine N-methyltransferase 5
PRMy : progéniteur de repopulation myéloïde
PRPF40B : Pre-mRNA-processing factor 40 homolog B
PRR : récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PTEN : phosphatase with tensin homolog
PTP : phosphotyrosine phosphatase
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis protein
PV : polyglobulie de Vaquez
P27^{kip} : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
RAF : RAF proto oncogene
RARS-T : anémie sidéroblastique réfractaire avec thrombocytose
RAS : rous sarcoma
RE : réticulum endoplasmique
RHC : rémission hématologique complète
RID : regulator of interferon induced death
RLR : RIG-I-like receptor
RMC : rémission moléculaire complète

RNASE-L : Rnase latente
ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
RYR : ryanodine
SCF : stem cell factor
SCID : severe combined immunodeficiency
SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase
SF1 : steroidogenic factor 1
SF3B1 : splicing factor 3B subunit 1
SHE : syndrome hyperéosinophilique
SHIP : SH2-containing 5'-phosphoinositol phosphatase
SHP1 : SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase
SH2 : src homology 2
SH2B3 : SH2B adapter protein 3
SHH : sonic hedgehog
SMD : syndrome myélodysplasique
SNP : single nucleotide polymorphism
SNRNP : petites protéines ribonucléiques
SOCS : suppressor of cytokine signaling
SOS : son of sevenless
SRSF2 : serine/arginine-rich splicing factor 2
STAT : signal transducer and activator of transcription
ST-CSH : cellule souche hématopoïétique à court terme
STING : stimulator of interferon genes
TE : thrombocytémie essentielle
TET2 : ten eleven translocation 2
TGF : facteur de croissance transformant
TLR : Toll-like receptor
TNF : facteur de nécrose tumorale
TPO : thrombopoïétine
TP53 : tumor protein 53
TRAIL : Tumor necrosis-Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRIM : tripartite motif protein
TYK2 : tyrosine kinase 2
UGGT : UDP-glucose glycoprotéine transférase
UPD : disomie uniparentale
USP18 : Ubiquitin-specific peptidase 18
U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
VEGF : vascular endothelial growth factor
VEGFR-2 : vascular endothelial growth factor receptor 2
VWF : facteur de Von Willebrand
XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein
ZRSR2 : U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2
α-KG : alpha kétoglutarate
2-HG : 2-hydroxyglutarate

Résumé

Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques sont des hémopathies malignes dues à des anomalies génétiques acquises au niveau des CSH. Parmi ces pathologies, on retrouve la Thrombocytémie Essentielle (TE), la Polyglobulie de Vaquez (PV) et la Myélofibrose Primaire (MFP). Les mutations responsables de ces maladies sont $JAK2^{V617F}$, des mutations de la Calréticuline (CALR) et de MPL (le récepteur à la thrombopoïétine) et activent toute la voie de signalisation du récepteur de cytokine/JAK2/STAT. Il existe différents traitements symptomatiques de ces maladies mais l'interféron alpha ($IFN\alpha$) est l'un des seuls traitements curatifs qui induit à la fois une réponse hématologique et moléculaire. L'objectif principal de ce travail consiste en l'étude et la caractérisation du mécanisme d'action de l' $IFN\alpha$ grâce à : i) une cohorte de patients traitée en clinique, ii) un modèle de souris knock-in $JAK2^{V617F}$, iii) des modèles de lignées cellulaires de souris et iv) des cellules primaires de patients traitées *in vitro*. Les effets de l' $IFN\alpha$ *in vivo* chez l'Homme sur différents compartiments hématopoïétiques d'une cohorte de patients atteints de TE/PV/MFP et portant les 3 mutations motrices ont été étudiés. Ainsi, les résultats dévoilent plusieurs ciblage préférentiels : des cellules progénitrices et souches (CPSH) $JAK2^{V617F}$ plutôt que des CPSH $CALR^{mut}$, des CPSH $JAK2^{V617F}$ plutôt que des cellules matures $JAK2^{V617F}$ ainsi que les clones homozygotes $JAK2^{V617F}$ plutôt que ceux hétérozygotes. La réponse à l' $IFN\alpha$ semble donc être liée à la présence de $JAK2^{V617F}$ contrairement à $CALR^{mut}$. Sur les lignées murines Ba/F3-MPL $JAK2^{WT/V617F}$, les résultats montrent que $JAK2^{V617F}$ améliore la sensibilité à l' $IFN\alpha$ en augmentant à la fois l'expression et la phosphorylation de STAT1 ainsi que l'expression de gènes cibles (ISGs) de l' $IFN\alpha$. Sa combinaison avec des inhibiteurs de JAKs dans les modèles *in vitro* et *in vivo* chez la souris suggère une inhibition complète de la voie de l' $IFN\alpha$ par le ruxolitinib (inhibiteur de JAK1/2) mais une potentialisation de la voie de l' $IFN\alpha$ et de son effet thérapeutique par le BMS911543 (inhibiteur de JAK2). Au final, ce travail montre une sensibilité particulière des patients $JAK2^{V617F}$ à l' $IFN\alpha$ en clinique et propose des combinaisons possibles de traitements capables d'optimiser la réponse grâce à la compréhension de son mécanisme d'action. Ce travail donne également des pistes explicatives quant aux résistances induites par ce traitement (mutations associées et fond génétique).

Abstract

Classical myeloproliferative neoplasms are hematological malignancies due to genetic abnormalities acquired in HSC. These diseases include Essential Thrombocythemia (ET), Polycythemia Vera (PV) and Primary Myelofibrosis (PMF). The main abnormalities are JAK2^{V617F}, Calreticulin (CALR) and MPL (TPO receptor) mutations and result in an activation of the cytokine receptor/JAK2/STAT-signaling pathway. There are several symptomatic treatments for these diseases but interferon alpha (IFN α) is one of the only curative drugs that lead both to hematological and molecular response. The main aim of this study is to decipher the mechanism of action of IFN α using i) an *in vivo* IFN α treated JAK2^{V617F} and CALR^{mut} patients cohort, ii) a knock-in JAK2^{V617F} mouse model, iii) murine JAK2^{V617F} and CALR^{mut} cell lines and iv) *in vitro* IFN α treated patients primary cells. The effects of *in vivo* IFN α in several hematopoietic compartments using a cohort of ET/PV/PMF patients harboring the 3 driver mutations have been studied. The results show several preferential targeting: JAK2^{V617F} stem and progenitor cells (HPSC) rather than CALR^{mut} HSPC, JAK2^{V617F} HPSC rather than JAK2^{V617F} mature cells and JAK2^{V617F} homozygous clones rather than heterozygous ones. Therefore, JAK2^{V617F} seems to be linked to IFN α response, in contrast to CALR^{mut}. On Ba/F3-MPL JAK2^{WT/V617F} cell lines, results show that JAK2^{V617F} greatly sensitizes to IFN α treatment on both STAT1 expression and phosphorylation as well as on ISGs expression. JAK inhibitors and IFN α combination treatments on *in vitro* and *in vivo* murine models induces a complete inhibition of IFN α -signaling pathway in the presence of ruxolitinib (JAK1/2 inhibitor) and synergize this signaling and the IFN α therapeutic effect with BMS911543 (JAK2 inhibitor). Altogether, these results show that JAK2^{V617F} patients are very sensitive to IFN α and allow the improvement of IFN α therapy through combination of treatment thanks to the understanding of its mechanism of action. This work also suggests some mechanisms of resistance to IFN α treatment (associated mutations and genetic background).

Etat-de-l'Art

Chapitre I. Introduction à l'Hématopoïèse

Le tissu sanguin est le tissu biologique le plus régénératif puisqu'environ 10^{12} cellules quittent la moelle osseuse adulte ou les tissus lymphoïdes quotidiennement chez l'Homme et remplacent un nombre équivalent de cellules sénescents, qui sont détruites lorsqu'elles arrivent au terme de leur vie. Les cellules du système hématopoïétique sont continuellement produites à partir d'un faible nombre de cellules quiescentes qui s'auto-renouvellent : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces cellules multipotentes, au sommet du système hématopoïétique, peuvent aussi se différencier en réponse à des signaux exogènes pour donner naissance aux progéniteurs, aux précurseurs puis aux cellules complètement différenciées, dites matures. Plus la cellule s'engage dans cette hiérarchie et plus elle est restreinte à un lignage spécifique. Cette relation entre CSH, progéniteurs et cellules matures forme un chemin complexe, orienté par l'action conjointe de cytokines et facteurs de croissance, de facteurs de transcription, de molécules de signalisation et du remodelage de la chromatine.

Dans le but de se maintenir, de se différencier et de préserver le maintien de l'homéostasie du système hématopoïétique, les CSH assurent une certaine balance entre auto-renouvellement, différenciation et apoptose.

1.1 Définitions

L'hématopoïèse est un processus hautement et finement contrôlé permettant un renouvellement cellulaire pour maintenir constant le nombre de cellules sanguines, indispensables à la survie de l'individu ou de l'organisme vivant. Ce processus génère les différents types cellulaires sanguins à partir des CSH et à travers des étapes de différenciation successives. On dénombre au moins 8 lignages hématopoïétiques subdivisés en 2 grands lignages. Le lignage myéloïde permet la production des globules rouges, des plaquettes, des macrophages et des granuleux alors que le lignage lymphoïde permet la production des lymphocytes T (LT), des cellules tueuses naturelles (NK), et des lymphocytes B (LB). Les cellules dendritiques peuvent être d'origine lymphoïde et myéloïde (**Figure 1**).

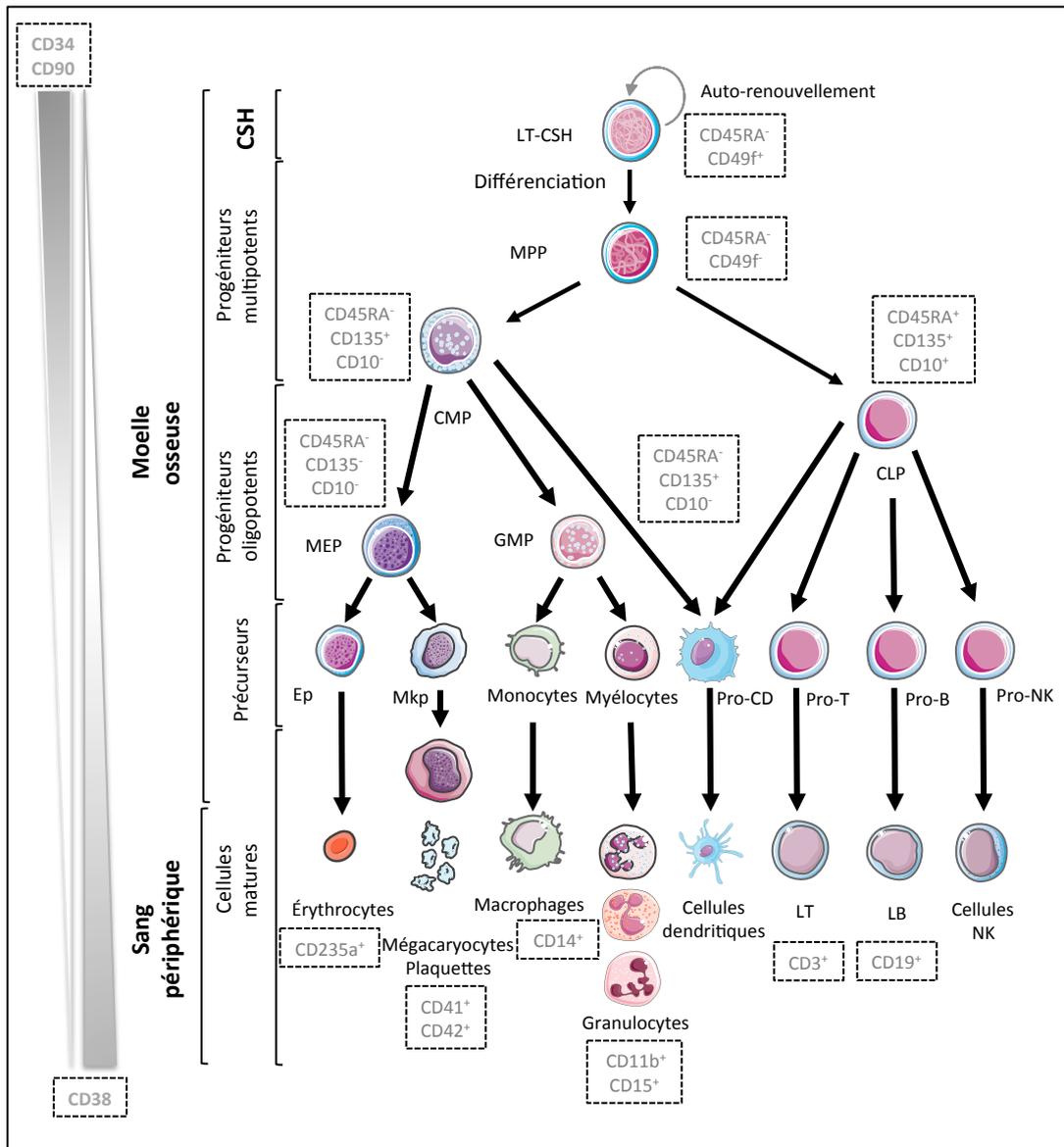


Figure 1. Hiérarchie de l'hématopoïèse humaine selon le modèle classique pyramidal. En haut de la pyramide, les cellules souches hématopoïétiques à long terme (LT-CSH) se divisent de manière asymétrique, en s'auto-renouvelant et en donnant naissance à des progéniteurs multipotents (MPP). Ces MPP se différencient en progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes communs (CMP/CLP). Les CMP s'engagent alors dans la différenciation myéloïde en produisant des progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) et granulomacrophagiques (GMP). Les progéniteurs oligopotents (MEP/GMP/CLP) donnent ensuite naissance aux précurseurs érythroïdes (Ep), mégacaryocytaires (Mkp), dendritiques (Pro-CD), aux myélocytes, aux monocytes, aux cellules naturelles tueuses (Pro-NK), ainsi qu'aux lymphocytes pro-T et pro-B qui sont restreints à un seul lignage et qui vont ensuite se différencier en cellules effectrices matures à la base de la pyramide. Les panels gris correspondent aux marqueurs utilisés pour isoler les différentes populations hématopoïétiques humaines.

Au stade prénatal chez l'Homme, l'hématopoïèse se développe à partir du feuillet mésodermique, au niveau des îlots du sac vitellin : on parle d'hématopoïèse extra-embryonnaire, ou hématopoïèse primitive. Par la suite, des CSH vont émerger de cellules endothéliales de l'aorte dorsale de la région AGM (aorte-gonade-mésonephros) intra-embryonnaire et migrer vers le foie fœtal qui sera le premier organe hématopoïétique, puis dans la rate et la moelle osseuse en fin de vie fœtale : on parle alors d'hématopoïèse définitive. Chez l'adulte, l'hématopoïèse a

exclusivement lieu dans la moelle osseuse et certains tissus lymphoïdes, qui prennent déjà la relève des autres sites durant la deuxième partie de la vie fœtale.

Le système hématopoïétique adulte passe donc par deux phases : la première, l'hématopoïèse primitive, permet une grande production de cellules primitives comprenant des globules rouges, des macrophages et des plaquettes nécessaires à l'oxygénation, à la survie de l'embryon et au remodelage des tissus et la deuxième, l'hématopoïèse définitive, permet la mise en place de tous les lignages hématopoïétiques et la production des CSH capables de coloniser la moelle osseuse et de développer l'immunité acquise¹.

1.2 Description et caractérisation de la hiérarchie hématopoïétique

Dans un modèle classique hiérarchique et pyramidal, les CSH, qui résident au sommet de cette pyramide hématopoïétique, et les progéniteurs hématopoïétiques représentent moins de 1% des cellules hématopoïétiques et sont responsables du processus de production et de remplacement continu des différentes cellules sanguines. Dans ce modèle de mitose asymétrique, une CSH peut donner 2 cellules : l'une capable de s'auto-renouveler afin de conserver un stock suffisant tout au long de la vie et d'éviter son épuisement, tandis que l'autre permet la différenciation vers les stades progéniteurs puis précurseurs afin d'assurer la production des cellules du sang². Les CSH à long terme (Long-term CSH ou LT-CSH), à fort potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation vers plusieurs lignages, diffèrent des CSH à court terme (Short-term CSH ou ST-CSH) par leur auto-renouvellement limité. Les ST-CSH génèrent alors des progéniteurs multipotents (MPP), qui ont toujours un potentiel de différenciation vers tous les lignages mais une capacité amoindrie à l'auto-renouvellement et marquent le point de séparation qui donnera naissance aux progéniteurs oligopotents à capacité de différenciation plus restreinte. Ces étapes de détermination se font depuis un progéniteur myéloïde commun (CMP) ayant la capacité de se différencier en progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP) et en progéniteur granulo-monocytaire (GMP)³ et d'un progéniteur lymphoïde commun (CLP) qui se différencie en différents précurseurs lymphoïdes pour donner tous les types de lymphocytes participant à l'immunité innée et acquise (lymphocytes T, lymphocytes B, cellules NK) (**Figure 1**).

A titre d'exemple, les GMP donneront naissance aux granuleux et aux macrophages qui assurent l'immunité innée, et les MEP aux mégacaryocytes et plaquettes qui assurent un rôle crucial dans l'hémostase et aux globules rouges qui transportent l'oxygène aux tissus⁴.

La base de la pyramide hématopoïétique est représentée par les cellules matures. Cependant, du fait de leur courte durée de vie pour la majorité, un processus continu d'alimentation est nécessaire amenant à une production de 1,5 millions de cellules par seconde chez l'adulte.

Les CSH sont des cellules hautement hétérogènes et leur identification ne se fait pas sur la morphologie, mais sur la base de tests biologiques de reconstitution et plus récemment sur la présence de combinaisons de marqueurs, essentiellement immunologiques, à la surface des cellules : l'immunophénotypage.

Historiquement, le premier essai *in vivo* décrivant des CSH a été publié en 1961 par Till et McCulloch qui ont identifié des colonies du donneur de plusieurs types dans la rate appelées CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen) après greffe de moelle à des souris syngéniques létalement irradiées⁵. Classiquement, chez l'Homme, ces tests de reconstitution *in vivo* sont effectués dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID). En 1965, Bradley et Metcalf ont mis en évidence via des essais clonaux *in vitro* en milieu semi-solide (agar, méthylcellulose et coagulum plasmatique) non pas des CSH mais des progéniteurs hématopoïétiques murins du lignage granulo-macrophagique⁶. Il est probable que les vraies CSH soient capables de cloner *in vitro* mais leur identification précise n'est basée que sur des essais de reconstitution qui restent la technique de référence. Dans les essais biologiques, les progéniteurs hématopoïétiques sont classés en fonction de leur capacité de prolifération et leur capacité à produire soit plusieurs lignées (progéniteurs multipotents, bipotents ou encore progéniteurs myélo-lymphoïdes), soit une seule lignée (progéniteurs oligopotents ou engagés). Ces essais biologiques ont permis une meilleure identification de la hiérarchie hématopoïétique et une première description des CFU (Colony Forming Unit) ou CFC (Colony Forming Cell). Ils ont aussi permis la caractérisation de différents facteurs de croissance hématopoïétiques (Colony Stimulating Factor ou CSF). Ainsi, il a été montré que les CSH génèrent un progéniteur multipotent appelé CFU-GEMM (Colony Forming Unit-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Mégacaryocyte). Les CFU-GEMM se différencient pour générer des progéniteurs plus matures : les progéniteurs granulo-monocytaires

(CFU-GM), éosinophiliques (CFU-Eo), basophiliques/mastocytaires (CFU-B/mast) et mégacaryocytaires (CFU-MK). Les progéniteurs érythroblastiques, suivant leur capacité de prolifération et leur réponse aux cytokines, sont subdivisés en deux grandes catégories: les progéniteurs immatures ou BFU-E (Burst Forming Unit-Erythroid) et les progéniteurs plus matures ou CFU-E (Colony Forming Unit-Erythroid). Après un certain nombre de divisions cellulaires, les progéniteurs génèrent des précurseurs immatures (myéloblastes, monoblastes, proérythroblastes et mégacaryoblastes) qui commencent à exprimer les principales protéines spécifiques des cellules matures de leur lignée. Enfin, suite à un nombre limité de mitoses, ces précurseurs donnent naissance aux cellules matures qui quittent la moelle osseuse pour être libérées dans le sang, tels que les granuleux, les mastocytes, les monocytes, les globules rouges et les plaquettes.

Les tests d'immunophénotypage permettent une caractérisation plus facile de la hiérarchie des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques. Le CD34, antigène le plus fréquemment utilisé, est, chez l'Homme contrairement à la souris, exprimé sur la quasi-totalité des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques⁷. Cependant, moins de 5% des cellules possédant l'antigène CD34 sont capables de générer des cultures à long terme (LTC-IC), propriété propre aux CSH. D'autres marqueurs ont ensuite été mis en évidence : Thy1 (ou CD90) en association avec le CD34 définit une population de cellules pouvant se différencier dans tous les lignages chez les souris SCID. Les cellules positives pour le CD34 et négatives pour le CD38 ont également la capacité de générer tous les lignages de la moelle⁸. En effet, le marqueur CD38 est graduellement exprimé sur les cellules au cours de la différenciation hématopoïétique. Ainsi, les CD34⁺CD38^{low} sont capables de reconstituer des souris NOD/SCID, mais seulement à court terme⁹ et correspondent en majorité à des cellules CD34⁺CD38^{-/low}CD45RA⁻CD90⁻¹⁰. Les cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ sont, quant à elles, enrichies en LT-CSH. Le CD45RA, comme le marqueur HLA-DR, est généralement absent ou peu exprimé sur les CSH et les progéniteurs immatures. De manière assez inattendue, une fraction cellulaire Lin⁻CD34⁻CD38⁻CD93^{hi} est également capable de s'auto-renouveler et de repeupler l'hématopoïèse dans des souris immunodéficientes¹¹.

Les marqueurs KIT et KDR -ou VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)- sont aussi exprimés sur les CSH et certains progéniteurs hématopoïétiques, respectivement sur environ 2/3 et 0,1 à 0,5% des cellules CD34⁺.

Les cellules CD34⁺KDR⁺ ou CD34⁺KIT⁺ sont enrichies en cellules de type LTC-IC et en cellules capables de reconstituer des souris NOD/SCID^{12,13}. Le marqueur CD133 est peu utilisé puisque souvent redondant avec d'autres marqueurs et définit une sous-population de cellules CD34⁺ immatures¹⁴. Récemment, de nouveaux marqueurs ont été mis en évidence: le CD49b est exprimé à la fois sur les LT-CSH et ST-CSH¹⁵ tandis que le CD49f est exprimé sur seulement 50% des cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺, qui sont alors capables de reconstitution à long terme. Les cellules CD49f⁻, quant à elles, ne peuvent reconstituer que transitoirement¹⁶. Il est toutefois important de noter que la plupart de ces études a été réalisée à partir de sang de cordon car il est difficile d'obtenir des reconstitutions efficaces à partir de cellules CD34⁺ de moelle osseuse dans les souris immunodéficientes. La quasi-totalité des progéniteurs hématopoïétiques engagés est purifiée dans la fraction CD34⁺CD38⁺ et, grâce à des marqueurs immunologiques, il est possible de les séparer en CMP, GMP, MEP, Ep (précurseurs érythroïdes: BFU-E et CFU-E) et en Mkp (précurseurs mégacaryocytaires), aussi bien chez l'Homme que dans les modèles murins.

Chez la souris, les marqueurs des CSH et progéniteurs sont légèrement différents. Les différentes lignées hématopoïétiques sont distinguables par les marqueurs d'immunophénotypage présentés en **tableau 1**.

LSK	Lin ⁻ c-Kit ⁺ Sca-1 ⁺
LT-CSH (SLAM)	Thy1.1 ^{low} Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁻ flk ⁻ CD150 ⁺ CD48 ⁻
ST-CSH	Thy1.1 ^{low} Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ flk ⁺
MPP	Thy1.1 ⁻ Lin ⁻ c-kit ⁺ Sca-1 ⁺ CD34 ⁺ flk2 ^{high} SLAM ⁻ CD150 ⁻ CD48 ⁻
CLP	Lin ⁻ c-kit ^{low} Sca-1 ^{low} ILR-7Rα ⁺
CMP	Lin ⁻ c-kit ⁺ FcγR ^{low} CD34 ⁺
MEP	Lin ⁻ c-kit ⁺ FcγR ^{low} CD34 ⁻ CD16 ⁺ CD32 ⁻
GMP	Lin ⁻ c-kit ⁺ FcγR ^{high} CD34 ⁺ CD16 ⁺ CD32 ⁺

Tableau 1. Les marqueurs de l'hématopoïèse murine

1.3 Destin et engagement cellulaire : théories et modèles

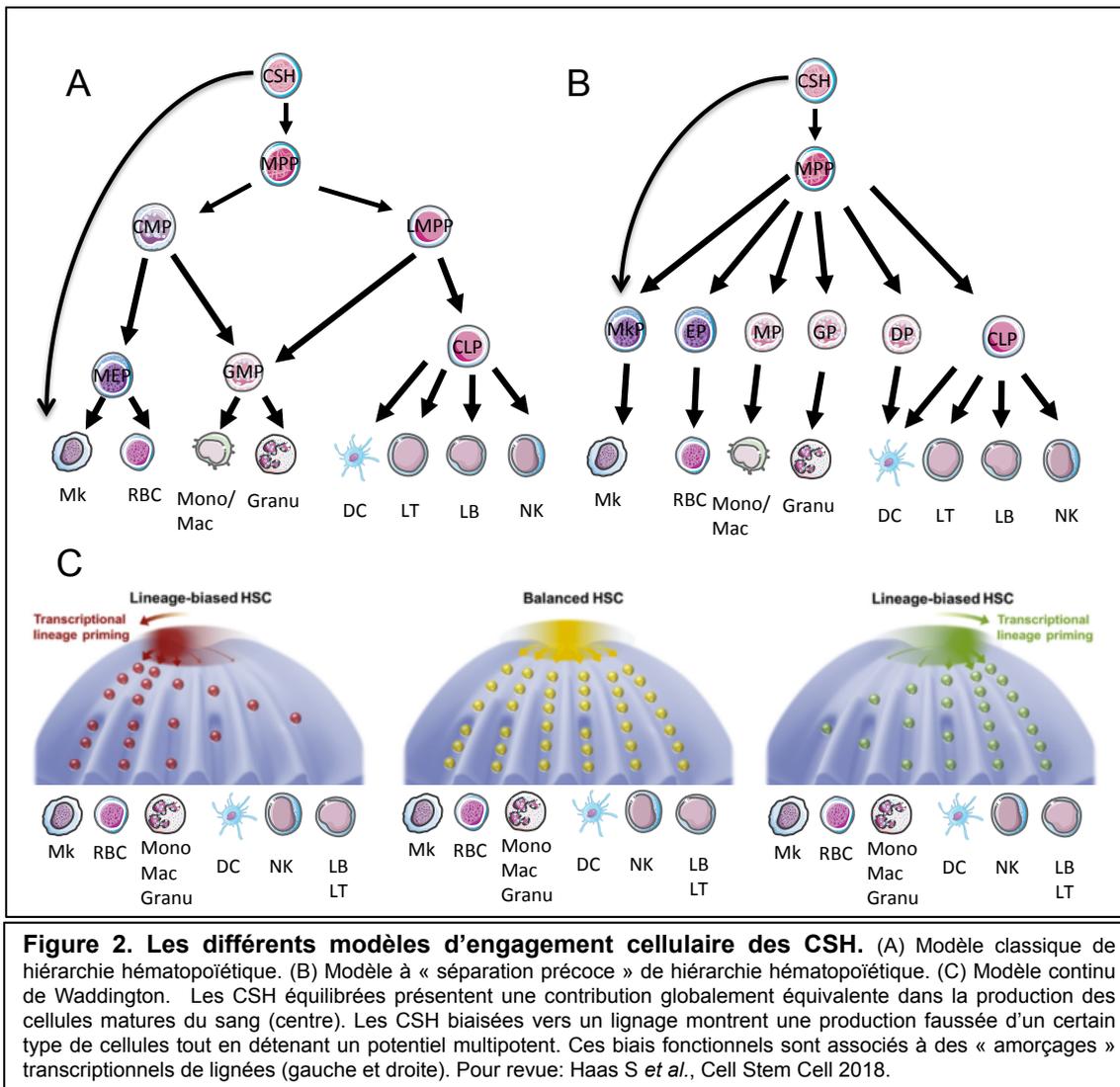
La différenciation hématopoïétique est un processus unidirectionnel dans lequel le potentiel de multipotence est progressivement perdu au profit de l'engagement. Toutefois, le procédé par lequel une CSH choisit de se différencier pour acquérir une identité et un destin cellulaire propre ou au contraire de s'auto-renouveler est méconnu et peut être expliqué par plusieurs modèles.

Dans un « modèle stochastique »¹⁷, les facteurs intrinsèques génétiques et épigénétiques de la cellule ainsi que les facteurs extrinsèques (*stimuli*) déterminent le destin cellulaire de manière aléatoire. En d'autres termes, les cytokines, les récepteurs aux cytokines et les facteurs de transcription jouent un rôle permissif plutôt qu'instructif.

De manière opposée, le « modèle déterministe »¹⁸ insiste sur le rôle prédéterminé de ces facteurs intrinsèques et extrinsèques dans la différenciation souche et dans la sélection du lignage. En effet, pour mener à bien ce processus de différenciation, les CSH entrent dans un état d'« amorçage » dans lequel le remodelage de la chromatine permet l'expression de gènes spécifiques de certains lignages et la répression d'autres gènes en lien avec l'auto-renouvellement¹⁹. Ces cellules amorcées vers un lignage, sous l'influence de *stimuli* externes et via la liaison de cytokines à des récepteurs spécifiques, sont prêtes à exprimer des facteurs de transcription positifs ou négatifs. Cette interaction cytokine-récepteur commande donc la régulation des voies de signalisation pour induire alors le destin des CSH²⁰.

L'idée que l'hématopoïèse dérive de manière hiérarchique d'un progéniteur commun a été développée par Maximow en 1909. Encore aujourd'hui, cette théorie est sujette à discussion et est surtout étudiée dans des modèles murins.

Dans le modèle classique repris plus haut, les étapes de différenciation sont séquentielles et se font par le biais de progéniteurs intermédiaires ce qui permet d'expliquer le fonctionnement hématopoïétique par une approche « par étapes » simple, en forme d'arbre^{3, 21}. Cette approche soutient une certaine homogénéité au sein de la population des CSH. Un raccourci direct vers le lignage mégacaryocytaire a aussi été envisagé (**figure 2A**).



En 2010, Kawamoto et coll. proposent un modèle alternatif (non-classique) dans lequel un progéniteur myélo-lymphoïde (MLP) possède un potentiel de différenciation vers à la fois les lignages myéloïdes, via le GMP, et lymphoïdes via le progéniteur lymphoïde précoce (PLP) et le CLP. Il peut toutefois se différencier directement en cellules dendritiques et en monocytes.

Le « myeloid bypass model » est un modèle alternatif plus récent dans lequel les CSH génèrent des progéniteurs de repopulation myéloïdes (PRMy) qui peuvent s'auto-renouveler et se différencier comme des CSH. Ces PRMy se composent de progéniteurs de repopulation myéloïdes communs (PRMC), de progéniteurs de repopulation mégacaryocytaire (PRMk) et érythro-mégacaryocytaire (PREM)²².

Néanmoins, des études récentes par approche unicellulaire ont révélé une forte hétérogénéité moléculaire et fonctionnelle au sein de la population multipotente, ce qui évoque une séparation des lignages beaucoup plus précoce qu'attendue et qui

s'affranchit des étapes progénitrices : il s'agit du modèle à « séparation précoce »^{23, 24, 25} (**figure 2B**).

Dernièrement, le modèle continu de Waddington a été mis en avant (**figure 2C**). Il s'agit d'un modèle dans lequel les CSH ne passent pas à travers différents états intermédiaires stables mais acquièrent graduellement et de manière continue des états transcriptomiques d'engagement vers une lignée. Dans un tel modèle, les MPP et les CMP ne représentent pas de réels types cellulaires mais plutôt des états transitoires dans le continuum « CPSH » (cellules progénitrices et souches hématopoïétiques)^{25, 26, 27}.

Toutefois, il faut garder à l'esprit que, chez l'Homme, les observations actuelles sont toujours en faveur d'un modèle classique²⁸.

1.4 Régulation de l'hématopoïèse : homéostasie et microenvironnement

Les cellules matures du système hématopoïétique ont une durée de vie très courte, nécessitant des mécanismes de contrôle de l'homéostasie efficaces. Dans le but de se maintenir et de produire des progéniteurs, les CSH conservent une balance entre auto-renouvellement et différenciation à travers des divisions cellulaires asymétriques. Néanmoins, les mécanismes qui régissent ces processus sont peu compris.

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'auto-renouvellement des CSH, comme les voies Hox, Notch, Sonic Hedgehog (SHH) et Wnt qui sont aussi associées à l'oncogenèse, ce qui suscite une capacité commune à l'auto-renouvellement des CSH et des cellules souches cancéreuses (CSC).

La plupart des CSH sont dites quiescentes et résident en phase G₀ du cycle cellulaire²⁹. En effet, la très faible pression proliférative les protège des mutations lors de la réplication de l'ADN et des dommages induits par des produits du métabolisme. En entrant en différenciation, les CSH deviennent de plus en plus actives et développent un avantage prolifératif au fil des mitoses, ce qui conduit à un besoin de mise-au-point fine de l'homéostasie des cellules matures.

Comme d'autres types cellulaires, les CSH sont sujettes à l'apoptose et à la mort cellulaire programmée. En effet, la surexpression de l'oncogène BCL-2 induit une augmentation de la fréquence des LT-CSH et une résistance aux irradiations dans

des souris transgéniques³⁰, suggérant une implication de l'apoptose dans l'homéostasie hématopoïétique.

D'autre part, les besoins de l'organisme sont variables dans le temps et font intervenir de nombreux acteurs qui vont permettre d'induire une certaine adaptation de la production de cellules sanguines. Cette régulation est assurée en grande partie par des facteurs de croissance appartenant à la famille des cytokines : les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de nécrose (TNF), les facteurs de croissance comme le CSF, les chimiokines et certaines hormones comme la thrombopoïétine (TPO) produite par le foie et l'érythropoïétine (EPO) produite par le rein, qui sont aussi des cytokines.

Les cytokines sont une grande famille de ligands extracellulaires. Glycoprotéines membranaires ou sécrétées suite à une stimulation, elles provoquent un signal de cascade de phosphorylation par leur liaison à des récepteurs spécifiques situés à la membrane plasmique, ce qui peut induire des réponses biologiques de survie, de prolifération, de différenciation, de maturation, et d'activation de fonction³¹ en modifiant l'activité de facteurs de transcription, ou du fait de modifications transcriptionnelles ou épigénétiques directes.

Il existe une soixantaine de facteurs de croissance, que l'on peut scinder en trois groupes de par leur homologie de structure et leur site d'action au cours de l'hématopoïèse :

- Les facteurs de compétence tels que les interleukines 1, 4, 6 (IL-1, IL-4, IL-6), le Stem Cell Factor (SCF), et le ligand de Fms-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3-L) permettent la mise en cycle des CSH quiescentes et les sensibilisent à l'action des facteurs multipotents.
- Les facteurs multipotents tels que l'Interleukine 3 (IL-3) et le Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor (GM-CSF) induisent la survie et la différenciation des CSH et sont retrouvés à tous les stades de la différenciation myéloïde.
- Les facteurs spécifiques de lignée tels que le Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF), le Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) mais aussi l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'EPO et la TPO agissent de manière plus tardive sur les cellules engagées dans une lignée cellulaire en favorisant la multiplication cellulaire et la maturation de précurseurs spécifiques.

Néanmoins, cette classification est biaisée du fait que certains facteurs, comme le SCF ou la TPO, ont des rôles multiples à la fois dans les stades précoces et tardifs de l'hématopoïèse.

L'hématopoïèse est assurée par des interactions complexes entre ces différentes cytokines, qui peuvent favoriser la différenciation myéloïde (SCF, IL-3), érythroïde (SCF, IL-3, EPO), mégacaryocytaire (SCF, IL-3, TPO) ou bien encore granulomonocytaire (SCF, IL-3, GM-SCF). Les IFN et le TNF- α mettent en cycle les CSH tandis que le TGF- β permet leur mise en quiescence par blocage des cellules en phase G₁ du cycle cellulaire. Le déséquilibre de ces différents signaux, tantôt stimulateurs, tantôt inhibiteurs, peut générer une myélosuppression et une défaillance de la moelle osseuse.

L'hématopoïèse est aussi régulée par un système complexe de composants non-cytokiniques liés au microenvironnement médullaire : les niches hématopoïétiques telles que les niches sinusoidale, péri-artériolaire ou endostéale. Elles sont composées de cellules stromales réparties dans la matrice extracellulaire et sont importantes dans le maintien des propriétés souches des CSH, leur engagement dans un lignage et leur progression dans la différenciation³². Le stroma se compose entre autres de fibroblastes, de cellules épithéliales, endothéliales, d'ostéoblastes, d'adipocytes, de cellules d'origine hématopoïétique (ostéoclastes, macrophages, mégacaryocytes, cellules lymphoïdes) et de médiateurs du système nerveux sympathique sécrétant des facteurs solubles (angiopoïétine, noradrénaline).

L'interaction entre le stroma médullaire et les cellules hématopoïétiques se fait par liaison directe ou par le biais de molécules sécrétées et peut assurer une régulation positive (prolifération et survie induites par les facteurs de croissance) ou une régulation négative (arrêt du cycle induit par TGF- β 1).

D'autres cellules souches sont présentes dans la moelle osseuse -les cellules souches mésenchymateuses (MSC)- et permettent aussi la régulation de l'hématopoïèse en étant à l'origine de la plus grande partie des cellules de la niche hématopoïétique : les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales et les myoblastes³³. Les MSC permettent à la fois l'émergence de ces cellules stromales, et la sécrétion de la quasi-totalité des cytokines nécessaires à l'auto-renouvellement ou la différenciation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques³⁴.

Finalement, l'hématopoïèse est avant tout un processus hautement orchestré de production et de maintien de tous les types cellulaires sanguins matures à partir d'une CSH et sous le contrôle de *stimuli* internes et externes au système hématopoïétique. Certaines hémopathies malignes ou aplasies peuvent résulter d'une altération de ces *stimuli* et contribuer au vieillissement du système hématopoïétique, processus important dans l'émergence de ces maladies.

Chapitre 2. Les néoplasmes myéloprolifératifs

Déjà sous l'Antiquité, la théorie des humeurs, développée par Hippocrate et reprise plus tard par Galien, témoigne du concept de maladie ayant pour cause un excès de sang. Ce concept se caractérisait à l'époque par un déséquilibre des « quatre humeurs » avec une prédominance de l'humeur sanguine –*plethora*– qu'il fallait rééquilibrer par des saignées.

Depuis, beaucoup d'études ont été entreprises pour comprendre l'origine, l'évolution, la diversité et la complexité des hémopathies malignes. Ce que les grecs appelaient « excès d'humeur sanguine » n'est autre que le résultat d'altérations de facteurs génétiques et épigénétiques qui perturbent les processus d'homéostasie, à savoir l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation cellulaire.

2.1 Les néoplasmes myéloïdes

Les néoplasmes myéloïdes (NM) sont classées en cinq groupes clinico-pathologiques : les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP), les syndromes myélodysplasiques (SMD), les formes intermédiaires entre les deux appelées néoplasmes myélodysplasiques/myéloprolifératifs (SMD/NMP), les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les néoplasmes myéloïdes et lymphoïdes associés à une éosinophilie et à des anomalies du PDGFRA, PDGFRB et FGFR1³⁵. Ce sont des hémopathies malignes et clonales de la myélopoïèse dues à des dérégulations au niveau de la CSH ou d'un progéniteur plus ou moins engagé dans le cas des LAM.

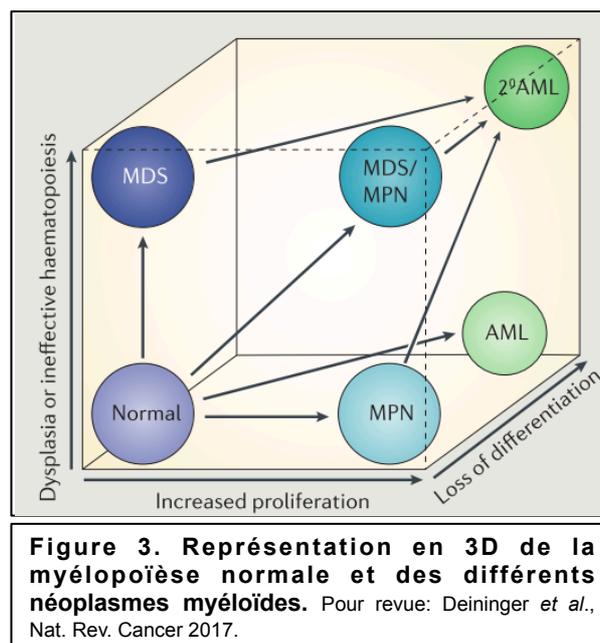
Les NMP se définissent fréquemment par une hématopoïèse extra-médullaire –dans le foie ou le rein– ainsi que par un excès de prolifération d'un ou plusieurs lignages myéloïdes bien que la morphologie des cellules soit normale et que leur différenciation soit maintenue, contrairement aux LAM et aux SMD.

Les SMD, quant à eux, connaissent une diminution du nombre d'érythrocytes, de granuleux, et de plaquettes dans le sang (cytopénies), tandis que la moelle osseuse est souvent hyper-cellularisée. Ils se caractérisent aussi par une dysmorphogénèse des cellules myéloïdes et par des dysplasies, ce qui évoque la présence d'une hématopoïèse mature mais inefficace.

Les LAM sont caractérisées par un arrêt de la différenciation et par une prolifération de blastes, principalement dans la moelle osseuse, qui conduit à une production altérée de cellules matures.

Enfin, certaines maladies comme la leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) présentent à la fois des caractéristiques des NMP (hyperprolifération des monocytes) et des SMD (dysplasie des monocytes et des granulocytes) : on parle alors de transition SMD/NMP.

Ces différents sous-groupes sont toutefois liés puisque NMP et SMD ont une forte tendance d'évolution vers les LAM (**figure 3**).



2.2 Historique et classification des maladies myéloprolifératives

Au début du XIX^{ème} siècle, la leucémie myéloïde chronique (LMC), la thrombocytémie essentielle (TE), la polyglobulie de Vaquez (PV), la myélofibrose primaire (MFP) ainsi que le syndrome de Di Guglielmo (DGS) étaient déjà reconnues comme des maladies distinctes mais conduisant toutes à une hyperprolifération d'un des trois principaux lignages myéloïdes : le lignage granulocytaire concernant la LMC, le

lignage mégacaryocytaire concernant la TE, le lignage érythroïde concernant la PV et le DGS et les lignages granulocytaire et mégacaryocytaire concernant la MFP.

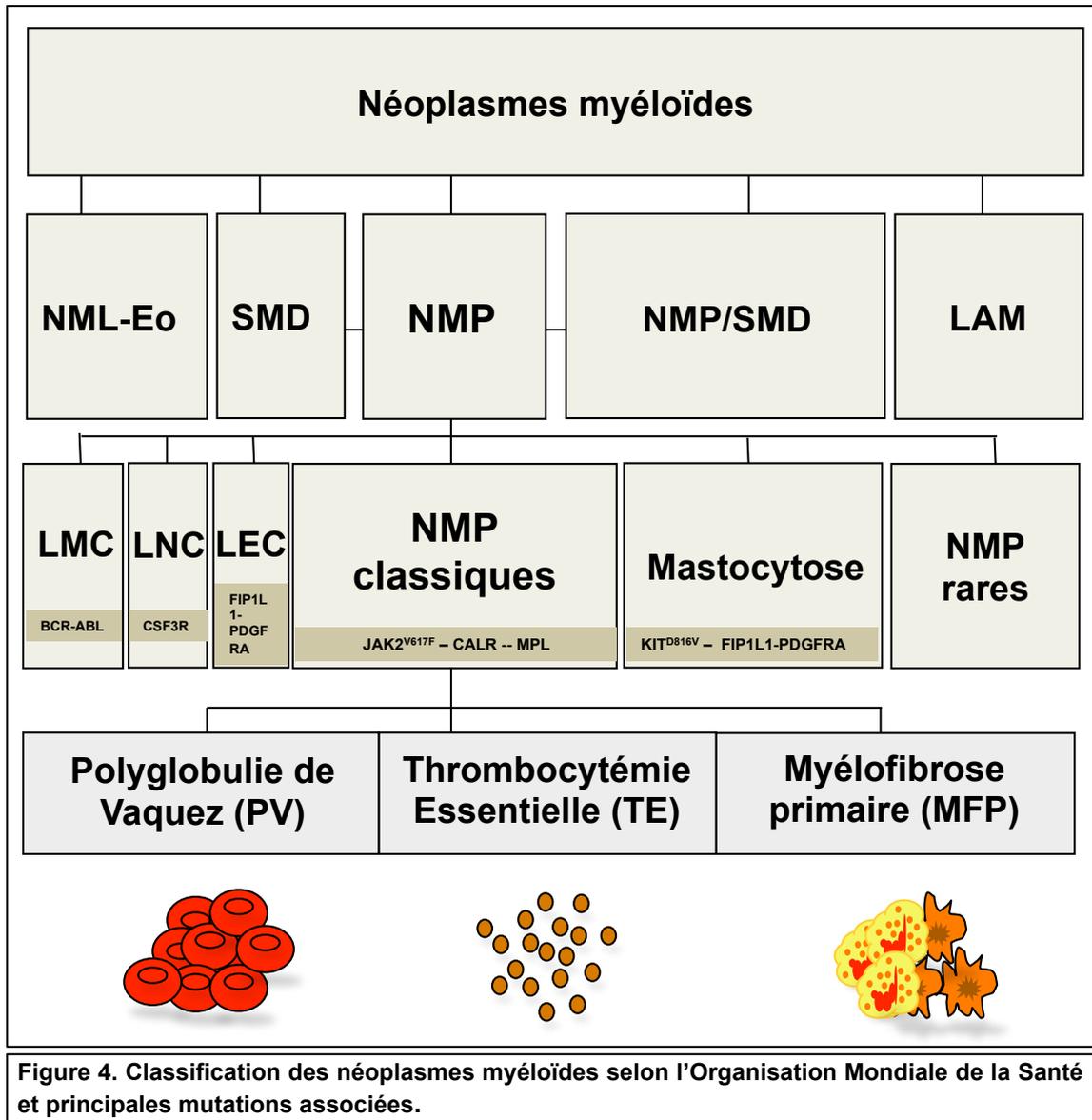


Figure 4. Classification des néoplasmes myéloïdes selon l'Organisation Mondiale de la Santé et principales mutations associées.

En 1951, William Dameshek remarque un certain chevauchement des caractéristiques cliniques et biologiques de ces différentes maladies, et propose une nouvelle classification plus juste. En effet, une PV se définit principalement par une érythrocytose, mais peut aussi présenter une prolifération des lignages mégacaryocytaire et granulocytaire. Une fibrose de la moelle osseuse et une splénomégalie peuvent aussi se développer lors d'une PV, pourtant caractéristiques d'une MFP. C'est ainsi que Dameshek propose de regrouper ces différentes maladies sous le terme de « maladies myéloprolifératives »³⁶. Depuis, seul le DGS, considéré comme une leucémie érythroïde, a été écarté de cette classification.

En 1960, la découverte du chromosome de Philadelphie³⁷, résultat de la translocation des chromosomes 9 et 22 aboutissant à la fusion des gènes Breakpoint Cluster Region (BCR) et Abelson (ABL1), entraîne alors une subdivision de la classification en maladies myéloprolifératives positives pour le chromosome de Philadelphie (Ph⁺) –la LMC- et négatives (Ph⁻) –la PV, la TE et la MFP.

En 2008, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a revu sa classification des hémopathies malignes myéloïdes et créa le terme de « néoplasmes myéloprolifératifs » (NMP)³⁸.

Grâce aux avancées du séquençage haut-débit (NGS) et des analyses transcriptionnelles, de nouveaux bio-marqueurs ont pu être identifiés ce qui a entraîné une dernière mise-à-jour de cette classification en 2016³⁵. A l'intérieur des NMP, on retrouve la LMC, la leucémie à neutrophiles chronique (LNC), la leucémie à éosinophiles chronique (LEC) ou syndrome hyperéosinophilique (SHE), la mastocytose, les NMP classiques –la TE, la PV, la MFP- et les autres NMP dits rares ou inclassables (**figure 4**).

2.3 Les anomalies moléculaires touchant les tyrosines kinases dans les NMP : l'exemple de la leucémie myéloïde chronique

En 1845, John Hughes Bennett mentionne pour la première fois la LMC, caractérisée alors par une hypertrophie de la rate et du foie³⁹. Dans les années 1960, Fialkow, par le biais de polymorphismes liés à l'X, montre qu'il s'agit d'une maladie clonale des CSH. C'est à cette même époque que Nowell et Hungerford découvrent le chromosome de Philadelphie caractérisé en 1973 par la translocation t(9 ;22)(q34 ;q11)⁴⁰. Dans les années 1980, le gène de fusion *BCR-ABL* est identifié, codant une protéine chimère à activité tyrosine kinase⁴¹ qui fut la première –et longtemps l'unique- kinase mutée et constitutivement active, identifiée et caractérisée dans les NMP, avant la découverte de la tyrosine kinase de fusion FIP1L1-PDGFR α dans les LEC⁴². Des mutations ponctuelles du gène du Colony Stimulating Factor 3-Receptor (CSF3R) ont été décrites dans des neutrophilies familiales, des LNC et des LMC atypiques. Ces dernières mutations entraînent une signalisation préférentielle par le biais des kinases JAK ou de la famille SRC-TNK2 et sont sensibles aux inhibiteurs des JAK ou des SRC⁴³.

La LMC se caractérise par une prolifération cellulaire touchant majoritairement la lignée granuleuse et présentant une hyperleucocytose massive (polynucléose neutrophile), une thrombocytose modeste et une splénomégalie dans 75 % des cas. Sans traitement, elle entraîne souvent la mort dans les 5 ans, en se transformant en LAM. Histologiquement, des mégacaryocytes de petite taille et hypo-lobés sont observés.

2.4 Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques et négatifs pour *BCR-ABL*

Les NMP classiques sont des hémopathies myéloïdes malignes et clonales de la CSH ayant pour conséquence une surproduction des cellules myéloïdes matures due à une hypersensibilité aux cytokines. Ce sont des maladies proches qui ont été regroupées sur la base de leurs caractéristiques cliniques et biologiques communes. Elles connaissent, comme la LMC, une dérégulation de la prolifération myéloïde, par l'intermédiaire fréquent de tyrosines kinases dérégulées (**Tableau 2**).

2.4.1. Les principales caractéristiques cliniques

2.4.1.1 La Thrombocytémie Essentielle (TE)

En 1934, bien avant la classification de Dameshek, Emil Epstein et Alfred Goedel décrivent la TE comme étant une « thrombocytémie hémorragique ».

Aujourd'hui, les symptômes cliniques sont globalement vasomoteurs : céphalées, vertiges, picotements et acrocyanose des membres, troubles de la vision pouvant mener à des événements thromboemboliques ou hémorragiques et syncopes. Une splénomégalie modérée est observée chez 40% des patients. Cependant, 25 à 35% des cas sont asymptomatiques et détectés accidentellement.

L'âge médian au diagnostic est de 65-67 ans, mais peut survenir à n'importe quel âge, avec une incidence de 1,5/100 000 cas dans la population générale⁴⁴. La médiane de survie approche, quant à elle, les 20 ans et reste le NMP dont l'évolution est la plus indolente. Le risque de thrombose ou d'hémorragie majeure est de 6,6% et 0,33% des patients par an respectivement. De 5 à 6% des TE évoluent en PV après 2,5 années, 8% après 10 ans, et 15% après 15 ans évoluent en MF⁴⁵. De 0,6 à 6% des cas peuvent aussi évoluer en LAM, ce qui reste plutôt rare (**Tableau 2**).

La TE se caractérise par une thrombocytose (nombre de plaquettes > 450.10⁹/L) sans érythrocytose ni leucoérythroblastose ainsi qu'une hyperplasie médullaire des mégacaryocytes dont le noyau est hyper-lobulé et le cytoplasme, mature. Les progéniteurs mégacaryocytaires montrent aussi une hypersensibilité à la TPO.

2.4.1.2. La Polyglobulie de Vaquez (PV)

En 1892, Louis Henri Vaquez, médecin français, décrit la polycythémie et la nomme « maladie de Vaquez ». C'est en 1903 que William Osler, médecin réputé, présente les caractéristiques majeures de cette nouvelle entité clinique : cyanose chronique, splénomégalie et érythrocytose.

Aujourd'hui, les symptômes les plus communément retrouvés sont les céphalées, les démangeaisons (*prurit* à l'eau), les symptômes vaso-occlusifs (acouphènes, paresthésie, érythromélgie) et la splénomégalie dans 70% des cas, dont le degré corrèle avec l'évolution de la maladie.

Un fort taux d'hématocrite (>49% chez l'homme, >48% chez la femme), une érythrocytose ainsi qu'une hémoglobine élevée (>16,5 g/dL chez l'homme, >16 g/dL chez la femme) sont les critères majeurs de la PV. La moelle osseuse est hypercellularisée du fait d'une hyperplasie à la fois des lignages érythroïde, granulocytaire, et mégacaryocytaire. La maladie peut intervenir à tout âge, mais les risques augmentent après 60 ans, notamment d'événements thrombotiques, surtout lorsqu'il s'agit de récives, dont la leucocytose est un facteur de risque moyen⁴⁶. La PV connaît une incidence d'environ 2/100 000 cas dans la population générale⁴⁴ et l'incidence des thromboses est estimée à 18 pour 1000 patients-années. La médiane de survie est de 13,5 années. 30% des PV évoluent naturellement vers une MF après 10/12 ans de diagnostic, et 2 à 5% développent une LAM au cours de la progression naturelle de la maladie⁴⁷ (**Tableau 2**).

Morphologiquement, les précurseurs érythroïdes et myéloïdes sont normaux mais les mégacaryocytes sont hyper-lobulés. Avec l'évolution de la maladie, les fibres de réticuline peuvent aussi augmenter. Néanmoins, les progéniteurs érythroïdes provenant de la moelle osseuse de patients atteints de PV sont capables de croître en absence d'EPO exogène⁴⁸, soutenant l'idée d'un lien entre l'anomalie moléculaire et la régulation de la réponse cytokinique.

2.4.1.3. La Myélofibrose Primaire (MFP)

En 1879, Gustav Heuck décrit la MFP comme une splénomégalie massive, des globules rouges nucléés circulants, un nombre élevé de leucocytes morphologiquement anormaux, une fibrose médullaire, une ostéosclérose ainsi qu'une intense hématopoïèse extra-médullaire³⁹.

Dyspnée, fatigue et cachexie, sueurs nocturnes, fièvre et saignements sont des symptômes récurrents de la MFP. Plus de 90% des MFP présentent une splénomégalie. Toutefois, 30% des patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic.

La maladie se développe vers 60 ans sans différence de sexe et son incidence est de 1,5/100 000 cas. La médiane de survie est d'environ 4-6 ans, ce qui fait de la MFP, le NMP classique au plus mauvais pronostic. Les causes de morbi-mortalité sont l'insuffisance médullaire, les thromboses ou hémorragies, et les transformations en LAM. Les patients de plus de 60 ans, mais aussi ceux qui présentent une leucocytose ou la mutation $JAK2^{V617F}$, ont de forts risques de développer des événements thrombotiques⁴⁹. D'autre part, environ 15 à 30% des MFP se transforment en LAM⁴⁷ (**Tableau 2**).

Le critère primordial est l'accumulation de fibres de réticuline dans la moelle osseuse accompagnée d'une hyper-cellularité médullaire, d'une expansion de la granulopoïèse au détriment de l'érythropoïèse, plutôt hypoplasique. La MFP peut manifester aussi des signes d'anémie, de leucocytose et/ou de thrombocytose. L'un des autres critères au diagnostic est l'hyperplasie mégacaryocytaire. La maladie se développe en deux phases : une phase initiale dite « pré-fibrotique » puis une phase fibrotique. Lors du stade pré-MFP, le diagnostic est dur à poser puisque la maladie ressemble à une TE. La moelle osseuse abrite de curieux mégacaryocytes denses et groupés en amas, aux noyaux hypo-lobulés, dont le rapport nucléo-cytoplasmique est anormal (signe d'un défaut de maturation) et dont le noyau est hyperchromatisé⁵⁰. Les frottis de sang périphérique témoignent d'une leucoérythroblastose ainsi que d'une anisopoïkilocytose avec des globules rouges en forme de larmes.

Lors de la phase fibrotique, une hypoplasie médullaire s'installe, les cellules hématopoïétiques sont alors remplacées par des adipocytes et des dépôts de fibres de réticuline et de collagène. Ce deuxième stade induit des modifications stromales et des profils anormaux de cytokines qui provoquent des réponses inflammatoires et

contribuent au phénotype clinique : fibrose médullaire, angiogenèse, hématopoïèse extra-médullaire ainsi que les symptômes majeurs (cachexie...) ⁵¹.

Pathologie	Lignées cellulaires impactées	Erythrocytose	Hémoglobine	Thrombocytose	Plaquettes	PNN	Myélocytes circulants	Manifestations cliniques	Splénomégalie (% de cas)	Survie médiane (années)	Evolution en LAM (% de cas)
TE	Mégacaryocytaire	=	=	+++	+++	±/+	0	Thrombose, hémorragie	40	19,8	0,6-6
PV	Erythrocytaire	+++	+++	+	+	±/+	0	HV, Thrombose, Prurit	70	13,5	2-5
Pré-MFP	Granuleuse + Mégacaryocytaire	=	=		++	++	++	SG	90	15-17	15-30
MFP fibrotique	Granuleuse + Mégacaryocytaire	=	---	+	±/-	±/-	+++	SG, IM	100	4-6	

Tableau 2. Vue d'ensemble de la présentation clinico-biologique et des complications des NMP classiques négatifs pour BCR-ABL.
Adapté de Tefferi *et al.*, Blood 2014. PNN= Polynucléaires neutrophiles; SG= signes généraux (perte de poids, fièvre, sueurs); HV= hyperviscosité (céphalées, vertiges, troubles visuels); IM= insuffisance médullaire (paleur, asthénie, hémorragie, infections).

2.4.2. Les principales caractéristiques moléculaires

2.4.2.1 Des facteurs moléculaires communs

Ces maladies peuvent évoluer de manière linéaire : la TE peut évoluer en PV, qui peut à son tour évoluer en MF, ou la TE peut aussi directement évoluer en MF ce qui suggère l'implication de facteurs moléculaires communs à ces trois maladies, via des récepteurs de lignages myéloïdes différents.

2.4.2.1.1 Les mutants JAK2 : JAK2^{V617F} et les mutations de l'exon 12

Les mutants JAK2^{V617F}

En 2005, différentes équipes, dont la nôtre, ont publié la découverte d'une mutation somatique correspondant à la substitution d'une guanine en thymine (G>T) dans l'exon 14 et codant une phénylalanine à la place d'une valine en position 617 (V617F) au niveau du domaine pseudo-kinase JAK Homology 2 (JH2) de la protéine JAK2^{52, 53, 54, 55}. La mutation JAK2^{V617F} entraîne une rigidification de l'hélice alpha C de ce domaine JH2 favorisant la trans-phosphorylation de JAK Homology 1 (JH1) et l'abrogation de l'auto-inhibition du domaine kinase de la protéine, conduisant ainsi à une activation constitutive de la tyrosine kinase JAK2. Cette modification structurale est liée à de nouvelles interactions entre les phénylalanines 617 et 595⁵⁶. Ainsi, JAK2^{V617F} va permettre l'activation des voies de signalisation telles que les STATs, la voie MAPK ou PI3K, et induire des messages de différenciation, de prolifération et de survie cellulaire.

Cette mutation est retrouvée dans près de la moitié des TE et des MF et dans 95% des PV (**Figure 5**). Elle est acquise dans le système hématopoïétique puisqu'elle n'est pas présente dans les cellules non hématopoïétiques^{53, 73}.

Dans les granulocytes d'environ 30% des PV, dans la majorité des MF, mais plus rarement dans les TE, on retrouve une charge allélique de JAK2^{V617F} supérieure à 50% : on parle alors d'homozygotie⁵⁸. De plus, la plupart des patients atteints de PV ou de MF (surtout post-PV ou post-TE) portent la mutation JAK2^{V617F} à l'état homozygote au niveau des progéniteurs après culture à l'échelon clonal alors que la plupart des patients atteints de TE l'ont à l'état hétérozygote, bien que de rares clones homozygotes puissent être détectés⁵⁹. Ces données suggèrent que la

transition de l'état hétérozygote à l'état homozygote de $JAK2^{V617F}$ jouerait alors un rôle crucial dans l'évolution des NMP, par une signalisation et une expression de gènes cibles accrues à travers à la fois une double dose de $JAK2^{V617F}$ et une absence de $JAK2^{WT}$.

L'homozygotie de $JAK2$ avait été suggérée, précédemment à la découverte de la mutation, par des études génomiques haut-débit sur les pertes d'hétérozygotie (LOH). En effet, parmi une cohorte de 20 NMP, 33% des PV –mais aucune TE- ont présenté une LOH sur le chromosomes 9p, et ce, à la fois dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes, indiquant une acquisition au niveau des CSH⁶⁰. Dans des études postérieures du groupe de Skoda, des analyses à l'aide de marqueurs microsatellites avaient permis d'avancer que cette LOH du 9p est retrouvée dans environ 34% des PV, 22% des MFP et 3% des TE parmi une cohorte de 244 individus. De plus, des analyses de PCR quantitative sur les patients présentant la LOH du 9p ont révélé la présence de 2 copies de $JAK2$, montrant qu'il s'agissait bien d'une recombinaison mitotique et non d'une délétion chromosomique. Le séquençage du 9p a permis d'identifier le point de cassure de la recombinaison mitotique entre les chromatides sœurs qui a lieu sur une région longue de 0,9 Mpb sur le 9p, entre les marqueurs D9S1681 et D9S1852, région donc fragile en terme de recombinaison homologue. Il en résulte des tailles de régions chromosomiques différentes, comprenant au moins 85 gènes dont $JAK2$, et partageant un intervalle en commun d'au moins 4,8 Mpb⁵³.

La découverte de la mutation $JAK2^{V617F}$ dans plus de la moitié des NMP négatifs pour $BCR-ABL$ a permis une réelle avancée dans la compréhension moléculaire de ces maladies. La structure et les conséquences fonctionnelles de la protéine seront discutées dans le chapitre 3.

Les mutations de l'exon 12 de $JAK2$

Suite à la découverte de la mutation $JAK2^{V617F}$, des efforts ont été entrepris afin d'identifier les mutations en cause dans les PV, TE et MFP $JAK2^{V617F}$ négatifs. Le séquençage de tous les exons de $JAK2$ a permis de révéler des mutations gain-de-fonction de $JAK2$ au niveau de l'exon 12 dans environ 3-4 % des patients $JAK2^{V617F}$ négatifs atteints uniquement de PV⁶¹, bien qu'ils puissent développer des MF secondaires⁶². Pratiquement tous les patients atteints de PV présentent donc une mutation au niveau de $JAK2$, que ce soit au niveau de l'exon 14 ($JAK2^{V617F}$) ou de

l'exon 12. Ces dernières mutations ne surviennent pas dans le domaine pseudo-kinase de JAK2, mais dans une région hautement conservée, immédiatement adjacente à celui-ci et s'étendant des résidus 536 à 547. Il y a plus d'une trentaine de mutations actuellement décrites, consistant en des substitutions, délétions et duplications. La plus fréquente d'entre elles est la délétion N542-E543. Sur le plan structural, bien que ne survenant pas dans le domaine pseudo-kinase de JAK2 mais, dans une région de liaison entre celui-ci et le domaine SH2, les mutations au niveau de l'exon 12 ont un effet similaire à la mutation JAK2^{V617F}. En effet, dans une représentation en 3 dimensions, les résidus concernés se trouvent dans une boucle localisée, comme celle contenant V617, à l'interface entre les domaines kinase et pseudo-kinase de JAK2. Les différentes mutations pourraient perturber de la même manière l'action inhibitrice du domaine pseudo-kinase sur le domaine kinase, et induire une indépendance cytokinique des progéniteurs érythroïdes. De plus, récemment, le groupe de Skoda a montré que les mutations de l'exon 12 étaient capables de réguler l'érythropoïèse globale et plus particulièrement le métabolisme du fer *via* une augmentation de l'érythroferrone circulante et une diminution du taux d'Hepcidine⁶³.

D'un point de vue clinique, les patients porteurs des mutations de l'exon 12 sont diagnostiqués à un âge plus précoce, et ils présentent un phénotype principalement érythrocytaire, avec un taux d'hémoglobine accru par rapport aux patients JAK2^{V617F} tandis que leurs taux de plaquettes et de leucocytes sont généralement normaux ou inférieurs. Cependant, il ne semble pas y avoir de différences dans l'évolution clinique de ces patients comparés aux patients JAK2^{V617F} en terme de survenue de thromboses, de MF secondaires et de leucémies aiguës⁶². Les mutations de JAK2 au niveau de l'exon 12 sont par ailleurs retrouvées dans la majorité des cas à l'état hétérozygote, et sont aussi rapportées chez un patient JAK2^{V617F} mais dans un clone indépendant⁶⁴.

2.4.2.1.2. Les mutants MPL

La mise en évidence de mutations dans le gène de JAK2 et les éléments de plus en plus concordants concernant l'implication de la voie JAK2/STAT dans les NMP a conduit d'autres équipes à rechercher des mutations dans les récepteurs associés à JAK2 : MPL, EPOR et G-CSFR. Ceci a permis la mise en évidence d'une mutation gain-de-fonction de MPL en position 515 de l'exon 10, appelée MPL^{W515L}⁶⁵. Par la

suite, d'autres mutations ont été décrites : les mutations W515K/R/A/G/S⁶⁶. Le tryptophane en position 515 fait partie d'un domaine amphipatique de 5 acides aminés situé à la jonction entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique de MPL : RWQFP. Il a été démontré qu'il prévient la dimérisation de MPL en l'absence de cytokine alors que sa substitution par une leucine, lysine, arginine ou alanine, entraîne l'activation constitutive du récepteur⁶⁷. La mutation ^{S505N} a également été décrite dans de rares cas sporadiques de TE et de MF bien qu'elle soit surtout décrite dans des cas familiaux⁶⁸. Celle-ci est localisée dans le domaine transmembranaire du récepteur et induit également sa dimérisation et son activation en l'absence de ligand. Enfin, de très rares mutants atypiques de MPL (T119I, S204F, E230G, Y591D/N, S204P) ont depuis peu été mises en évidence dans les TE et MF dites « triple négatives »^{69,70}. Ces mutations ont une activité gain-de-fonction, mais plus faible que celle des mutations de MPL^{W515X} et pourraient être associées à d'autres événements moléculaires pour induire le phénotype. Les mutations de *MPL* sont retrouvées dans environ 5 % des MF et 3 % des TE, la mutation ^{W515L} étant la plus fréquente (**Figure 5**).

Sur le plan clinique, les patients présentant une TE *MPL* mutée ont généralement un âge supérieur au moment du diagnostic, un taux d'hémoglobine plus bas et une thrombocytose supérieure par rapport aux patients *JAK2*^{V617F}⁷¹. Bien qu'ils semblent présenter des anomalies plus fréquentes de la microcirculation et un risque plus élevé de survenue de thrombose artérielle, il ne semble pas y avoir de différence en termes de survie, d'évolution leucémique ou fibrotique. Enfin, les MFP mutés *MPL* sont, quant à elles, plus souvent des femmes âgées, avec une anémie plus sévère et une plus grande probabilité de devoir bénéficier d'un support transfusionnel régulier⁷².

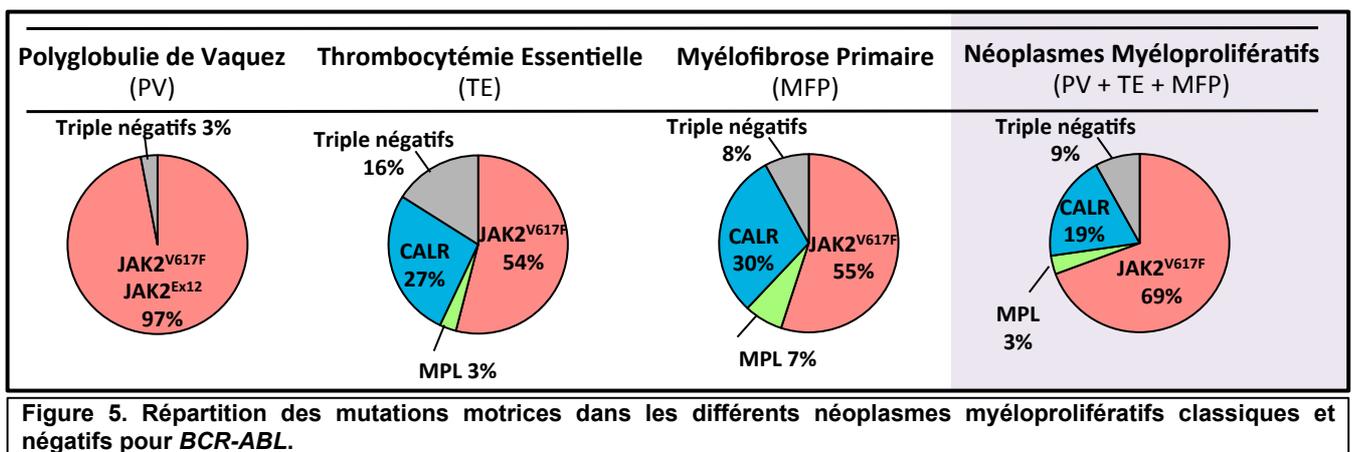
2.4.2.1.3 Les mutants CALR

En décembre 2013, deux groupes ont rapporté de manière indépendante la découverte de mutations dans l'exon 9 du gène *CALR* sur le chromosome 19p13.2 qui consistent en des insertions ou des délétions entraînant un décalage du cadre de lecture^{73,74}. Ces mutations de *CALR* sont retrouvées dans plus de 50% des TE et des MFP sans mutation de *JAK2* ou de *MPL* et au total dans environ 25 à 30% des patients présentant une TE ou une MFP (**Figure 5**). Ces mutations sont également

retrouvées dans les anémies sidéroblastiques réfractaires avec thrombocytose (RARS-T), mais avec une fréquence très faible par rapport à $JAK2^{V617F}$ 73.

Plus de 50 types de mutations différents ont été détectés à l'heure actuelle, mais les mutations les plus fréquentes et comptant pour plus de 80-90 % des cas sont soit une délétion de 52 paires de bases (appelée mutation de type 1 ou $CALR^{del52}$), soit une insertion de 5 paires de bases (mutation de type 2 ou $CALR^{ins5}$). Ces mutants n'ont pas la même prévalence parmi les TE et les MF : le mutant $CALR^{del52}$ est plus fréquemment associé aux MFP (70%) que $CALR^{ins5}$ (15%) tandis que la fréquence de ces deux mutations est proche en cas de TE (51% et 39%) 75. Les patients atteints de TE ont généralement un taux de plaquettes accru, mais auraient un risque thrombotique plus faible que les patients $JAK2^{V617F}$ 73. Par ailleurs, ils présentent une charge allélique très supérieure aux patients présentant une TE $JAK2^{V617F}$, ce qui pourrait suggérer une charge allélique plus forte des cellules CALR mutées au niveau du compartiment des CSH. Les MFP mutés CALR présentent une survie accrue par rapport aux patients $JAK2^{V617F}$, ce qui est cependant limité aux mutations de type 1 76. La structure et les conséquences fonctionnelles de la protéine seront discutées dans le chapitre 3.

Au total, les NMP sont dus à trois mutations clés qui affectent la voie JAK2/STAT et qui contribuent pour 85 à 90% des anomalies moléculaires responsables des NMP classiques. Il reste donc environ 10% d'anomalies moléculaires inconnues dans les TE et MF et 2 à 5% dans les PV (Figure 5).



2.4.2.2. Des maladies acquises et clonales de la CSH

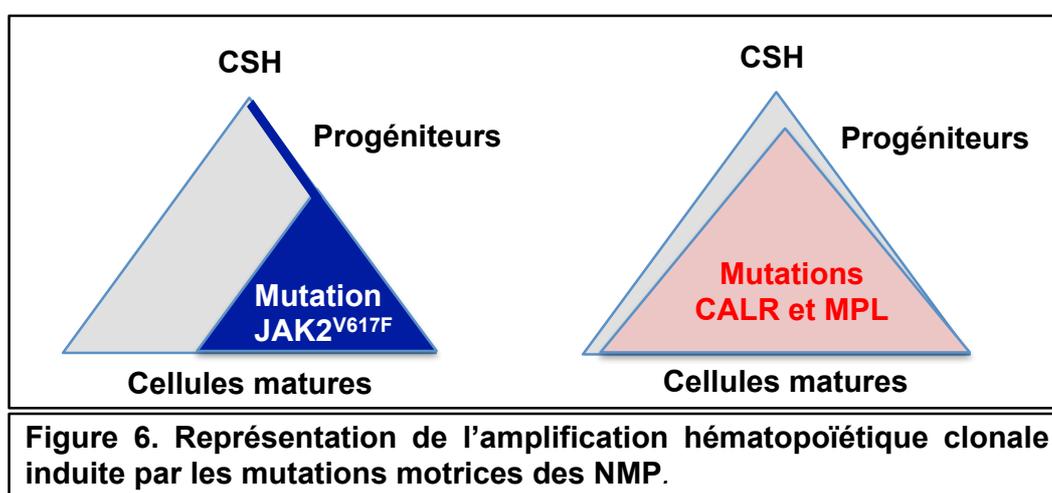
Les études de polymorphismes liés à l'X dans les années 1970 ont démontré le caractère clonal de ces maladies avec une implication de multiples lignages myéloïdes et ayant pour origine potentielle, les cellules souches multipotentes⁷⁷. La présence des mutations $JAK2^{V617F}$, MPL^{W515X} et $CALR^{mut}$ dans tous les lignages myéloïdes conforte l'idée que ces mutations clonales apparaissent au sommet de la hiérarchie hématopoïétique (**Figure 6**), et qu'elles sont somatiques puisqu'elles ne sont pas retrouvées dans les cellules non-hématopoïétiques^{53,73}.

En ce qui concerne $JAK2^{V617F}$, elle a été identifiée dans des progéniteurs lymphomyéloïdes de patients atteints de PV et de MFP⁷⁸ ainsi que dans les cellules lymphoïdes matures (principalement les LB et les NK) de certains patients atteints de PV et de MFP⁶⁶. Sa présence a été identifiée en isolant par cytométrie en flux différentes sous-populations de progéniteurs myéloïdes (CMP, GMP, MEP) ainsi que dans les compartiments enrichis en CSH ($CD34^+CD38^-CD90^+$)⁷⁹. Enfin, elle a été identifiée au niveau des CSH en utilisant des tests fonctionnels (culture à long-terme (LTC-IC)). Toutefois, chez l'Homme, les progéniteurs sont très hétérogènes avec généralement un pourcentage faible de cellules portant la mutation, en tous cas chez les patients atteints de TE⁸⁰, suggérant une dominance clonale faible au niveau du compartiment des CSH (**Figure 6**). De plus, $JAK2^{V617F}$ ne joue qu'un rôle mineur dans l'expansion des CSH chez l'Homme mais augmente le potentiel de différenciation myéloïde terminale dans les TE, PV, et MFP. Cette expansion est bien plus marquée avec les clones homozygotes qu'avec les clones hétérozygotes $JAK2^{V617F}$ ⁸¹. Les CSH $JAK2^{V617F}$ sont également capables de greffer dans un modèle de xénogreffes chez la souris immunodéficientes SCID. La proportion de cellules $JAK2^{V617F}$ capables de repeupler ces souris SCID ne présente pas de modifications majeures des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération par rapport aux cellules normales⁸². Ces études permettent donc de montrer que $JAK2^{V617F}$ est acquis au niveau CSH mais, du moins chez l'Homme, ne donne que très peu d'avantage à ce niveau.

Les mutations $MPL^{W515K/L}$, quant à elles, ont été détectées dans les granulocytes, les monocytes, les plaquettes ainsi que dans les NK mais pas dans les lymphocytes T de patients atteints de MFP. Ces mutations ont aussi été retrouvées dans des clones myéloïdes/B/NK issus de progéniteurs $CD34^+CD38^-$ ⁸³ (**Figure 6**). De plus, une reconstitution à long terme de cellules $CD34^+MPL^{W515X}$ dans des souris NOD/SCID

a été réalisée. Les mutations MPL^{W515X} sont donc acquises et déjà présentes au niveau de la CSH multipotente.

Enfin, à travers une cohorte de 138 patients, il a été montré que les TE mutées *CALR* détenaient une charge allélique plus importante au niveau des progéniteurs que les TE mutées $JAK2^{V617F}$. De plus, les charges alléliques au niveau des CSH dans les TE et les MF mutées *CALR* semblent équivalentes⁸⁴. Ces données concordent avec les résultats du laboratoire mettant en évidence la présence de *CALR* mutée dans toutes les lignées hématopoïétiques y compris les CSH à une fréquence très élevée (El-Khoury, communication personnelle) et suggèrent une dominance clonale plus importante de *CALR* mutée au niveau CSH que celle de $JAK2^{V617F}$ (Figure 6).



Ces observations permettent de conclure que la fréquence de clones mutés dans les phases chroniques de NMP est différente selon la mutation, avec toutefois une tendance similaire entre les TE et les MF mutées *CALR*.

Au total, les NMP classiques sont le fruit d'acquisitions d'anomalies moléculaires au niveau des CSH.

2.4.2.3. Une hyperprolifération des lignages myéloïdes

JAK2 joue un rôle crucial dans l'hématopoïèse pré et post-natale : le modèle murin knockout JAK2 (KO *Jak2*^{-/-}) est létal dès l'état embryonnaire par échec d'acquisition de l'érythropoïèse définitive, démontrant que JAK2 joue surtout un rôle au niveau de l'érythropoïèse. Cependant, les cellules de foie fœtal prélevées de ces embryons ne répondent pas aux cytokines telles que l'IL-3, le GM-CSF, l'IL-5 et la TPO, ce qui témoigne bien du rôle de JAK2 dans la réponse cytokinique⁸⁵.

La caractéristique majeure des patients atteints de NMP $JAK2^{V617F}$ (PV, TE et MFP) est l'indépendance aux cytokines des progéniteurs mégacaryocytaires et érythrocytaires, qui se révèlent par la formation de colonies spontanées en milieu semi-solide: des colonies endogènes érythroïdes (CEE) et mégacaryocytaires (CEM). Ces progéniteurs sont également hypersensibles aux cytokines comme l'EPO et la TPO^{78,86,87}. Avant même la découverte de $JAK2^{V617F}$, les progéniteurs avaient été aussi décrits comme hypersensibles à l'IGF-1, l'IL-3 et au GM-CSF^{88,89,90}. De plus, l'hypersensibilité à l'EPO est dépendante du statut hétérozygote ou homozygote des BFU-E $JAK2^{V617F}$ ⁷⁸, les BFU-E homozygotes étant beaucoup plus représentées dans les PV que dans les TE⁸⁶. Enfin, des cultures cellulaires de PV ou TE à partir de progéniteurs ont montré l'expansion tardive en cours de différenciation érythroblastique des clones homozygotes pour $JAK2^{V617F}$. Toutes ces données montrent bien que $JAK2^{V617F}$ ne donne que peu d'avantage au niveau CSH mais bien plus aux stades tardifs de la différenciation -surtout érythroblastique-, à l'état homozygote et quand l'expression des récepteurs cytokiniques tels que l'EPO-R augmente. Les mutations $MPL^{W515K/L}$, quant à elles, induisent une différenciation mégacaryocytaire spontanée en culture avec une réponse globale normale à la TPO. Les progéniteurs érythroïdes restent toutefois dépendants de l'EPO⁸³. Enfin, sur une cohorte de 302 patients atteints de TE, ceux qui sont mutés $CALR$ ou $JAK2^{V617F}$ montrent une proportion significativement plus importante de croissance spontanée de CEM que ceux mutés MPL ou triple négatifs, avec un nombre de CEM plus important dans le cas des patients mutés $CALR$. Aussi, parmi la population présentant des CEM, les patients mutés $CALR$ de type 2 induisent plus de CEM que ceux de type 1⁹¹.

Au total, les NMP classiques se caractérisent par une prolifération myéloïde accrue, à la fois indépendante et hypersensible aux cytokines.

2.4.2.4 Les modèles murins

La construction de modèles animaux a permis des avancées considérables aussi bien dans l'exploration et la compréhension de la physiopathologie des néoplasmes myéloprolifératifs que dans l'expérimentation d'interventions thérapeutiques.

Depuis la découverte de $JAK2^{V617F}$, de MPL^{W515X} et plus tard des mutations de $CALR$, beaucoup d'études *in vitro* et *in vivo* ont été menées dans le but d'élucider leur rôle dans l'initiation, la complexité et l'évolution de ces maladies. Jusqu'à

présent, trois différentes stratégies ont été développées pour générer des modèles murins possédant l'une des mutations : les modèles rétroviraux transduits par transplantation de moelle osseuse, les souris transgéniques, et les modèles de Knock-In (KI) génétiques.

Ces différents modèles miment les caractéristiques humaines des NMP et fournissent un aperçu de leur pathogénicité moléculaire, tout en permettant l'exploitation de nouvelles thérapies et la compréhension du rôle de mutations associées dans la progression et la transformation de la maladie.

Le modèle rétroviral est un moyen rapide d'expression d'un gène d'intérêt dans une population cellulaire sélectionnée *in vivo*. Plusieurs équipes ont opté pour cette technique dans le but d'étudier l'impact de JAK2^{V617F}, MPL^{W515X} ou CALR^{mut} sur l'hématopoïèse (**Tableau 3**). Ces mutations sont responsables du phénotype de la maladie : en effet, les modèles de souris par transplantation de moelle transduite avec les mutants JAK2^{V617F} développent une PV progressant vers la MF alors que les modèles avec CALR^{del52}, et à un moindre degré CALR^{ins5}, développent une thrombocytose pure suivie d'une MF pour les CALR^{del52} ^{92,93}. Dans une première étude, les souris receveuses développent une maladie comparable à la TE, qui évolue ensuite en MF concernant la mutation de type 1 et avec une pénétrance beaucoup plus faible pour la mutation de type 2 ⁹³. Ainsi, la myélofibrose pourrait être une évolution naturelle de la TE en cas de mutation de CALR. Dans une seconde étude, le phénotype mime une TE mais n'évolue pas en MF ⁹⁴. Toutefois, les deux études dénotent d'un avantage prolifératif de CALR^{mut} au niveau du lignage mégacaryocytaire, ainsi qu'au niveau des compartiments CSH concernant la mutation de type 1. Les mutants MPL^{W515L} induisent, quant à eux, un NMP caractérisé par une hyperleucocytose, une thrombocytose, une splénomégalie et une fibrose médullaire. Ce modèle a donc permis de conclure que l'une de ces trois mutations est suffisante et motrice au développement de la maladie, bien qu'il possède toutefois certains inconvénients, tels que la surexpression du transgène et un site d'intégration imprévisible.

Le deuxième type de modèle murin exploite la transgénése comme technique pour transférer l'ADN complémentaire (ADNc) JAK2^{V617F} ou CALR^{mut} dans des ovocytes de souris dans le but de générer des lignées transgéniques stables (**Tableau 3**). Tous les modèles transgéniques développent un NMP et démontrent clairement que le niveau d'expression de la mutation module le phénotype de la maladie : une

expression faible de JAK2^{V617F} mène à une TE tandis que son expression forte résulte en une PV. Le modèle transgénique CALR^{del52} est venu confirmer le développement d'une maladie de type TE, sans évolution en MF⁹⁵. De manière similaire au précédent modèle, le modèle transgénique ne récapitule pas la même maladie, probablement du fait du nombre et de la position des transgènes intégrés.

Modèles murins	Phénotype	Références
JAK2^{V617F}		
Modèles rétroviraux		
C57Bl/6	PV>MF	Lacout et al, Blood 2016; Wernig et al, Blood 2006; Zaleskas et al, PlosOne 2006
BALB/c	PV***>MF	Wernig et al, Blood 2006; Zaleskas et al, PlosOne 2006
Modèles transgéniques		
Vav huJAK2V617F	TE/PV>MF	Xing et al, Blood 2008
H2K muJAK2V617F	TE/PV>MF	Shide K et al, Leukemia 2008
Inductible JAK2min promoteur huJAK2V617F		
Vav Cre	TE	Tiedt R et al, Blood 2008
Mx Cre	PV (thrombocytose)	
Pf4Cre (spécifique des MK)	Pas de phénotype; TE légère et PV après transplantation	Etheridge SL et al, Proc Natl Acad Sci USA 2014; Zhan H et al, Leukemia 2016
Tie2Cre (cellules endothéliales et CSH)	TE neutrophile progressant vers une ostéopétrose avec diathèse saignante	Etheridge SL et al, Proc Natl Acad Sci USA 2014
Modèles KI		
muJAK2V617F constitutif	PV (thrombocytose)>MF	Marty C et al, Blood 2010
Induction germinale de muJAK2V617F	PV>MF	Mullally A et al, Cancer Cell 2010
E2Acre		
Induction germinale de huJAK2V617F (ADNc)		
Stella Cre		
Hétérozygote	TE légère	
Homozygote	PV	Li J et al, Blood 2014
muJAK2V617F		
Mx Cre		
Hétérozygote	TE/PV>MF	
Homozygote	PV***>MF	Akada H et al, Blood 2010
EpoR Cre (spécifique de la lignée érythroïde)		
Hétérozygote	Erythrocytose légère	
Homozygote	Erythrocytose	Akada H et al, Haematologica 2012
muJAK2V617F hétérozygote		
Vav Cre	TE>PV>MF	Hasan S et al, Blood 2013
Sci Cre	PV>MF	Lamrani L et al, Blood 2014
huJAK2V617F (ADNc) hétérozygote	TE légère>MF (10% des cas)	Li J et al, Blood 2010
Mx Cre		
CALR		
Modèles rétroviraux		
CALRdel52	TE légère, TE>MF	Elf S et al, Cancer Discovery 2016; Marty C et al, Blood 2016
CALRins5	TE légère	Marty C et al, Blood 2016
Modèles transgéniques		
promoteur H-2Kb	TE	Shide K et al, Leukemia 2016
Modèles KI		
muCALRdel61 constitutif	TE	Balligand T et al, Blood 2016
CALRdel52 humanisé inductible		
Vav Cre	TE	
SCL Cre ^{ER}	TE	Marty C, Plo C, Nivarthi H, Kralovics R, Vainchenker W (résultats non publiés)

Tableau 3. Les modèles JAK2^{V617F} et CALR^{mut} murins. Pour revue: Vainchenker *et al.*, Blood 2017.
 *= sévère ; **= sévère et léthale.

Ainsi, l'expression des mutations à des niveaux physiologiques est nécessaire et a pu être réalisé par le biais de modèles de souris KI, dans lesquels JAK2^{V617F} ou CALR^{mut} sont exprimés sous le contrôle de promoteurs endogènes (**Tableau 3**). Ces modèles ont profondément élargi nos connaissances sur la physiopathologie des NMP, notamment sur les conséquences fonctionnelles de JAK2^{V617F} ou CALR^{mut} sur les compartiments de cellules progénitrices et souches hématopoïétiques (CPSH). Toutefois, contrairement aux études cliniques, le modèle KI JAK2^{V617F} hétérozygote induit une thrombocytose modérée associée ou pas à une polyglobulie progressant vers un MF en fonction de l'espèce des gènes insérés (humains et murins), et aux stratégies mêmes de construction des modèles^{96,97,98}. Chaque modèle KI développe un NMP transplantable et le groupe de Mullally a montré que les cellules initiatrices des NMP résidaient dans le compartiment LSK. Un modèle KI permettant une

expression physiologique des mutants de CALR a également été publié reproduisant la thrombocytose suivie d'une MF sans donner réellement d'avantage majeur aux CSH mutées⁹⁹. Bien que, chez les patients, $JAK2^{V617F}$, MPL^{W515X} ou $CALR^{mut}$ soient retrouvées dans les LT-CSH^{79,83,84}, il semble que CALR donne un avantage plus important que $JAK2^{V617F}$ chez l'Homme alors que chez la souris ces données sont très controversées selon les modèles.

Au total, grâce aux modèles murins, les moteurs génétiques de la maladie ont été mis en évidence : $JAK2^{V617F}$, MPL^{W515X} et $CALR^{mut}$. On parle alors de mutations motrices, dont la présence seule suffit au développement de la maladie.

Une question reste toutefois en suspens : ces mutations induisent-elles l'expansion des CSH pour leur permettre de développer un avantage compétitif, ou, au contraire, une altération de leur activité¹⁰⁰ ?

2.4.2.5. Trois maladies, trois anomalies génétiques, un *continuum* ?

Les observations de Dameshek sont avérées, ces NMP classiques partagent bien des caractéristiques communes et forment un spectre de maladies fortement intriquées. Bien que l'érythrocytose ne soit retrouvée que dans la PV, la thrombocytose s'observe aussi bien dans la TE, la PV et la MFP. De la même manière, la splénomégalie et la fibrose médullaire sont principalement retrouvées dans les MFP, mais la splénomégalie est aussi présente dans 30% des PV et TE, et les fibres de réticuline s'accumulent aussi lors de l'évolution globale des PV et des TE. Ces deux dernières ont la capacité de développer une MF et toutes les trois peuvent se transformer en LAM.

La découverte des mutations $JAK2^{V617F}$, MPL^{W515X} et de la CALR marque un réel bouleversement dans l'histoire des NMP. En effet, elles réconcilient, d'une certaine manière, le concept de linéarité des 3 NMP classiques tout en soulevant, dans une autre mesure, la question de comment certaines mutations peuvent générer plusieurs maladies différentes : deux pour $CALR$ mutée ou trois pour $JAK2^{V617F}$. Plusieurs arguments viennent étayer l'hypothèse d'un continuum de maladie. Premièrement, l'étude des modèles murins évoquée plus haut, montre que ces mutations sont capables à elles seules d'induire les maladies et leur progression. La TE peut évoluer vers la MF en passant par la PV pour les $JAK2^{V617F}$ ou directement vers la MF pour les $CALR^{del52}$.

Deuxièmement, sur le plan clinique, les TE JAK2^{V617F}, contrairement aux TE mutées CALR ou MPL, se rapprochent des PV par une hémoglobine haute, une leucocytose, une érythropoïèse et une granulopoïèse médullaire, de faibles niveaux d'EPO mais un fort taux de thromboses veineuses¹⁰¹. Ainsi, la TE JAK2^{V617F} serait la manifestation atténuée d'une PV.

Troisièmement, les études moléculaires chez les patients montrent aussi que la charge allélique de JAK2^{V617F} augmente entre les TE et les MF¹⁰² mais aussi entre les TE, PV, MF post-TE et MF post-PV⁵⁸. D'autre part, l'homozygotie de JAK2^{V617F} est un événement principalement associé à la PV, comparativement à la TE, ce qui atteste de l'apport de la charge allélique de JAK2^{V617F} dans l'évolution du phénotype de la maladie⁸⁶. L'une des explications pour ces différences phénotypiques induites par JAK2^{V617F} est que les progéniteurs hétérozygotes JAK2^{V617F} ont une hypersensibilité à la TPO mais pas à l'EPO alors que les progéniteurs homozygotes JAK2^{V617F} y sont hypersensibles. Ceci suggère donc que le récepteur MPL est beaucoup plus sensible à JAK2^{V617F} en terme d'activation qu'EPO-R, probablement de part sa structure plus facilement activable⁸⁷. Au contraire, nous avons aussi montré qu'une forte signalisation via MPL peut entraîner la sénescence¹⁰³ suggérant que JAK2^{V617F} à l'état homozygote pourrait être délétère pour les cellules de la lignée mégacaryocytaire.

Toutes ces observations dénotent donc de l'existence d'un continuum de stades TE, PV et MF JAK2^{V617F} dont la TE et la PV seraient les stades chroniques, et la MF, le stade accéléré de la maladie. Toutefois, des mutations associées peuvent intervenir et modifier l'évolution et le phénotype des maladies.

2.4.3. Autres mutations associées

Un certain nombre de mutations impliquées dans la régulation négative de la voie JAK2/STAT, mais aussi dans la régulation épigénétique, des composants de l'épissage ou des facteurs transcriptionnels, ont été identifiées dans les NMP. Ces mutations ne sont pas spécifiques de ces maladies puisqu'elles sont aussi présentes dans d'autres hémopathies malignes (NMP/SMD, SMD et LAM) et ne sont pas responsables de la myéloprolifération, mais modifient plutôt le phénotype de ces maladies (**Figure 7**).

2.4.3.1. Les mutations impactant des voies de signalisation

LNK (Lymphocyte-specific adapter protein), ou SH2B3, est une protéine adaptatrice, inhibitrice de la voie JAK-STAT. Elle se lie à la tyrosine 813 phosphorylée de JAK2 via son domaine SH2 et entraîne l'inhibition de la voie, que celle-ci soit activée par la liaison du ligand à son récepteur (MPL ou EPO-R) ou par les mutations JAK2^{V617F} ou MPL^{W515X}. Les mutations de LNK ont été décrites pour la première fois en 2010, chez 2 patients, l'un atteint de MF et l'autre de TE¹⁰⁴. Par la suite, d'autres mutations ont été découvertes chez des patients atteints de TE, de PV et d'érythrocytose idiopathique¹⁰⁵. Ces mutations sont rares en phase chronique des NMP -moins de 2 % des cas-, mais semblent être plus fréquentes lors de la transformation leucémique (13 %). En fait, dans un certain nombre de cas, les mutations de *LNK* sont associées à d'autres mutations motrices comme JAK2^{V617F}, notamment lors de la progression des NMP vers la MF¹⁰⁴. La plupart des mutations décrites sont retrouvées à l'état hétérozygote et surviennent dans le domaine PH, « hot spot » s'étendant des résidus E208 à G234, bien que des mutations en dehors de ce domaine aient également été décrites. Etant donné que ce domaine PH pourrait être impliqué dans la localisation membranaire de la protéine, ceci devrait aboutir à une localisation anormale de la protéine mutée dans le cytoplasme.

Les **CBL** (Casitas B-cell Lymphoma) sont des E3 ubiquitine ligases et des protéines adaptatrices multifonctionnelles impliquées dans la transduction de la signalisation en réponse à différents *stimuli*, notamment dans la régulation négative des récepteurs aux tyrosines kinases. Elles ciblent les récepteurs cytokiniques (EPO-R, MPL), les tyrosines kinases (JAK2) et les adaptateurs de signalisation (GRB2) dans le but de favoriser leur dégradation protéosomale par ubiquitination. Jusqu'alors, la famille des CBL est composée de 3 membres : c-CBL ; CBL-b, et CBL-c¹⁰⁷. c-CBL est impliqué dans la régulation négative des voies de l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH. Les mutations de *c-CBL* sont retrouvées dans 6% des MF et très rarement dans les PV et les TE. Elles sont fortement associées à une disomie uniparentale (UPD) du chromosome 11q¹¹⁰. Elles suppriment l'activité ubiquitine ligase et confèrent un avantage prolifératif dans les lignées 32D sur-exprimant FLT3. Ces protéines mutées agissent comme dominantes négatives et inhibent leurs homologues CBL-b et CBL-c¹¹¹. Les mutations de *CBL* ont aussi été rapportées dans plus de 13% des LAM post-NMP, suggérant leur rôle potentiel dans la transformation

leucémique¹¹². Il a aussi été rapporté un cas de mutation *CBL* chez un patient atteint de MFP $JAK2^{V617F}$, dans lequel la mutation a persisté après la transformation leucémique tandis que le clone $JAK2^{V617F}$ avait disparu⁴⁷. Ces observations démontrent bien que les mutations de *CBL* sont associées à des phases particulièrement agressives de NMP (MFP ou LAM secondaire), ce qui leur confère un rôle dans la progression plutôt que dans l'initiation de la maladie.

La famille protéique des **SOCS** (Suppressor of Cytokine Signaling) est composée des SOCS 1 à 7 ainsi que de CIS, contenant toutes une box SOCS en C-terminal et un domaine central SH2 avec lequel elles se lient aux récepteurs cytokiniques dans le but de médier la régulation négative de la signalisation cytokinique. CIS et SOCS1-3 sont exprimées en réponse à une diversité de signaux cytokiniques et leur surexpression induit une inhibition de la signalisation par le biais d'une boucle de rétrocontrôle négatif. SOCS3 régule probablement l'érythropoïèse en inhibant $JAK2^{113}$ car les souris transgéniques SOCS3 ont le même phénotype sur l'érythropoïèse que les souris *Jak2*^{-/-}. Les mutations de SOCS sont très rares dans les NMP ($SOCS3^{F136L}$ dans les PV) même si une diminution de l'expression de SOCS1 et 3, du fait d'une hyperméthylation des îlots CpG, a été rapportée dans des PV/TE $JAK2^{V617F}$ et dans des TE négatives pour $JAK2^{V617F}$ et pour MPL^{W515X} ¹¹⁴.

L'hyperméthylation de SOCS2 est aussi observée dans les NMP et dans les lignées $JAK2^{V617F}$ positives. La répression de l'expression de SOCS2 serait donc une étape vers l'indépendance aux cytokines que l'on connaît dans les NMP¹¹⁵, bien que la coopération de SOCS et de $JAK2^{V617F}$ soit controversée. En effet, il a été montré que $JAK2^{V617F}$ développait la capacité d'hyper-phosphoryler SOCS3, le rendant incapable d'inhiber le mutant JAK2, ce qui lui permet d'échapper à sa régulation¹¹⁶. Par la suite, il a été montré que les protéines SOCS induisaient une dégradation préférentielle des protéines $JAK2^{V617F}$ ce qui empêchait potentiellement l'indépendance aux cytokines des cellules¹¹⁷. L'implication des SOCS reste donc encore à définir.

RAS est une petite GTPase qui agit à travers trois protéines de signalisation situées en aval -RAF, MEK et ERK/MAPK- dans le but de permettre la transmission de signaux cytokiniques vers le noyau. Il existe trois homologues de RAS chez les mammifères : HRAS, KRAS et NRAS. Les plus fréquentes mutations de *KRAS* et *NRAS* surviennent sur les codons 12, 13 et 61 et entraînent une activation dérégulée des voies en aval de RAS. Les mutations de *RAS* surviennent dans 13% des LAM post-NMP, suggérant sa forte implication dans la progression des NMP en LAM.

Toutefois, la mutation est aussi retrouvée dans les phases chroniques de NMP d'un patient atteint de LAM, remettant en question sa contribution claire à l'initiation de la maladie⁴⁷. La neurofibromine 1 (NF1), un régulateur négatif de RAS, est aussi retrouvée mutée dans les NMP, plus souvent dans les MF que dans les TE et PV¹¹⁸.

2.4.3.2. Les facteurs de régulation épigénétique

Des mutations du gène *TET2* (Ten-Eleven-Translocation 2) ont été identifiées dans les NMP de façon assez fréquente allant de 4 à 11 % dans les TE, 15 % dans les PV, 20 % dans les MFP et 26 % des leucémies post-NMP^{119,120}. Les mutations de *TET2* sont des pertes de fonction et incluent des mutations faux-sens au niveau de régions conservées ou de sites d'épissage, des mutations non-sens, des délétions ou des insertions résultant d'un décalage du cadre de lecture. Il a été décrit comme suppresseur de tumeur puisqu'il existe des mutations bi-alléliques. *TET2* appartient à une famille de trois membres incluant *TET1*, *TET2* et *TET3*. Les protéines correspondantes possèdent une fonction de 5-méthylcytosine dioxygénase dépendante de l' α -kétoglutarate (α -KG) et du fer, permettant la transformation de la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC). Elles participent donc à la régulation de l'expression génique. Les mutations de *TET2* sont associées à un défaut d'activité catalytique et globalement, les patients *TET2* mutés présentent un niveau de 5-hmC plus faible que les donneurs sains¹²¹. Les études sur la fonction de *TET2* dans les systèmes hématopoïétiques humain et murin montrent que le défaut de *TET2* entraîne une amplification des progéniteurs et des CSH avec de hauts potentiels d'auto-renouvellement et de capacité de repopulation à long-terme et induit la différenciation monocytaire aux dépens des différenciations granuleuse, lymphoïde et érythroïde¹²². Ainsi, ces données montrent que le défaut de *TET2* pourrait favoriser le développement des NMP et d'autres hémopathies malignes en induisant la dominance clonale au niveau d'une CSH mutée. Il faut aussi souligner que les mutations de *TET2* sont retrouvées dans la population générale de sujets âgés et associées à une hématopoïèse clonale¹²³. Ces mutations peuvent apparaître le plus souvent avant les mutations de signalisation comme *JAK2*^{V617F}, mais également après, surtout pour les mutations de *CALR*¹²⁴. L'ordre des mutations est important dans les NMP et pourrait avoir un impact sur le phénotype de la maladie. En effet, une étude a montré que l'acquisition d'une mutation de *TET2* avant *JAK2*^{V617F} résultait en un phénotype de TE alors que lorsque *JAK2*^{V617F} précédait la mutation de

TET2, les patients développaient plus fréquemment une PV¹²⁵. De plus, au cours de leur progression, les patients peuvent acquérir des mutations de *TET2* qui sont plutôt associées à un mauvais pronostic¹²⁴.

Les mutations de ***DNMT3A*** (DNA MethylTransferase 3A) sont parmi les plus récurrentes avec celles de *TET2* dans les NMP et ne sont retrouvées qu'à l'état hétérozygote. Elles sont présentes à 3 % dans les TE, 7 % dans les PV, 7-15 % dans les MFP et 14 % dans les leucémies post-NMP^{74,124}. La mutation la plus récurrente permet le changement du résidu R882 de la protéine. DNMT3A appartient à la famille des protéines méthyltransférases, responsable de l'ajout *de novo* d'un groupement méthyl aux cytosines des îlots CpG. Son rôle sur l'hématopoïèse semble très similaire à *TET2* puisque le modèle murin déficient en *Dnmt3a* présente aussi une augmentation des CSH dans la moelle osseuse et une diminution de leur potentiel de différenciation, corrélé à une hausse de l'expression des gènes de multipotence des CSH et une baisse des facteurs de différenciation. DNMT3A est donc un répresseur épigénétique de gènes spécifiques des CSH¹²⁶. Comme pour les mutations de *TET2*, l'ordre d'apparition des mutations semble important¹²⁷.

Les mutations d'***EZH2*** (Enhancer of Zeste Homolog 2) sont aussi décrites dans de nombreuses pathologies myéloïdes et lymphoïdes malignes. Dans les NMP, elles sont surtout présentes dans les MFP (13 %)^{74,124}. Les mutations d'*EZH2* sont de type perte-de-fonction incluant souvent des délétions. Ce sont des anomalies qui apparaissent généralement après les mutations de signalisation et qui sont de mauvais pronostic dans les MFP. Elles favoriseraient un phénotype mégacaryocytaire plutôt qu'érythroïde en association avec *JAK2*^{V617F}, entraînant des TE progressant vers des MF sans passer par la PV comme cela a été montré par 2 groupes^{128,129}. *EZH2* fait partie du complexe Polycomb Repressive Complex (PRC2) qui catalyse la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) avec *EZH1*, *SUZ12*, *EED* et *RBAP46/48*. Il s'agit d'un complexe protéique qui joue un rôle essentiel dans le développement, le destin cellulaire et la prolifération, et qui est connu comme un répresseur épigénétique global de la transcription. D'autre part, certaines délétions ou mutations somatiques recensées chez d'autres membres du complexe PRC2 (*SUZ12*, *JARID2*...) sont observées dans certaines PV ou d'autres NMP/SMD, démontrant ainsi que la fonction du complexe PRC2 peut être compromise par la mutation de différents gènes¹³⁰.

Les mutations d'**ASXL1** (Additional Sex Combs Like 1) sont retrouvées dans les hémopathies myéloïdes malignes, notamment dans de nombreux SMD et SMD/NMP (LMMC). Parmi les NMP, elles sont très rares dans les TE et PV (< 8%) et surtout présentes dans les MFP (13-47%) où elles sont les plus fréquentes parmi les mutations de gènes de facteurs épigénétiques^{131,132}. Les mutations d'**ASXL1** sont aussi corrélées à un très mauvais pronostic de survie et une évolution vers les leucémies¹³³. **ASXL1** est une protéine nucléaire présente dans les complexes Polycomb et est impliquée dans au moins deux processus de contrôle épigénétique de répression, en agissant sur PRC1 et sur PRC2. En effet, d'une part, la perte d'**ASXL1** induit l'activation de la protéine BAP1, une E3 ubiquitine ligase de l'histone H2A, ayant pour conséquence une inhibition de H2AK119Ub. D'autre part, **ASXL1** se fixe à EZH2 et la délétion d'**ASXL1** induit une perte de la marque H3K27me3 générée par PRC2.

Le dépistage des mutations de **IDH1/2** (Isocitrate Dehydrogenase 1/2) dans deux cohortes indépendantes a révélé peu de mutations en phase chronique des NMP (0,8 % des TE, 1,9 % des PV et 4 % des MFP)^{74,124}. En revanche, ces mutations sont très enrichies en phase blastique des NMP (21 %), indiquant un très mauvais pronostic de survie et de progression vers les leucémies. Les mutations sont généralement faux-sens hétérozygotes et ont pour conséquence une substitution sur les résidus R132 pour IDH1 et R140 et R172 pour IDH2. IDH1 et 2 codent les enzymes isocitrate déshydrogénase 1 et 2 qui participent à la catalyse de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -KG et leur activité est nécessaire à la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Les enzymes mutées IDH1/2 ont une affinité réduite à l'isocitrate, mais possèdent une nouvelle activité catalytique consistant en la synthèse de 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir du α -KG. Ainsi, la forte diminution de la quantité d' α -KG diminue l'activité enzymatique de TET2 et d'autres enzymes dépendant de ce cofacteur. En effet, il a été montré que les mutants IDH2 altèrent l'activité catalytique de TET2. Comme la déplétion de TET2, celle d'IDH1/2 altère la différenciation hématopoïétique et augmente le nombre de cellules progénitrices ou souches¹³⁵. Enfin, il a été montré que 2-HG est un antagoniste de l' α -KG et qu'il intervient dans des altérations des histones, de la méthylation de l'ADN ainsi que du métabolisme du glucose. Tous ces résultats suggèrent un mécanisme en partie commun de leucémogénèse des mutations **IDH1/2** et **TET2**.

2.4.3.3. Les gènes de la machinerie de l'épissage

L'épissage de l'ARN est un processus fortement régulé faisant intervenir de petites protéines ribonucléiques (snRNP) et d'autres composants protéiques dans le but de transformer les pré-ARNm en des ARNm matures par élimination des introns. Chez les patients atteints de NMP, des anomalies correspondant à des mutations de cette machinerie sont retrouvées dans 9,4% des cas, presque exclusivement des MFP¹³⁶.

SF3B1, un gène clé de l'épissage, est muté tout particulièrement dans les SMD, mais aussi dans 3 % des TE et dans 4 à 7% des MFP. Néanmoins, les mutations de **SF3B1** ne semblent pas influencer la survie des patients et ne sont pas associées aux thromboses.

Les mutations de **SRSF2** (Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2) sont retrouvées dans 17 % des MFP et dans 19% des leucémies post-NMP. Elles sont significativement associées aux mutations d'**IDH** mais aussi de **TET2** (dans les LMMC), suggérant que **SRSF2** muté est aussi impliqué dans le phénomène de transformation leucémique des NMP. **SRSF2** possède un domaine RRM (RNA Recognition Motif) qui se fixe à l'ARN, et un domaine RS (riche en sérines) qui permet le recrutement des autres composants protéiques du complexe d'épissage. D'autres gènes de cette machinerie tels que **U2AF1**, **ZRSR2**, **PRPF40B** et **SF1** sont retrouvés mutés dans moins de 2% des NMP, mais les conséquences fonctionnelles de ces mutations dans ces pathologies restent encore obscures bien qu'il existe une corrélation entre la présence de mutations de **U2AF1** et l'importance des anémies dans les MFP.

2.4.3.4. Les facteurs de transcription impliqués dans la leucémogénèse

Le gène **TP53** (Tumor Protein P53) code le suppresseur de tumeur P53, impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence après dommage génomique et est fréquemment dérégulé dans de nombreux cancers. Les mutations de **P53** sont identifiées dans 5 à 10% des LAM *de novo*. Bien que présentes dans 3,1% des phases chroniques des NMP, elles sont fortement associées à la transformation des NMP en LAM (environ 30%)¹³⁷ et sont généralement homozygotes. De plus, des amplifications du chromosome 1q ont été retrouvées dans 18 % des leucémies post-NMP alors qu'elles sont présentes dans 0,2% des cas de NMP chroniques. La région minimale amplifiée sur ce chromosome comporte **MDM4**, un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de **P53**, souvent amplifié

dans différents types de cancers. L'amplification de *MDM4* et les mutations de *P53* sont donc des événements mutuellement exclusifs et mettent en avant le rôle important de cet axe dans la transformation des NMP en LAM.

Le facteur de transcription **RUNX1** (AML1 ou encore CBFA2) ainsi que CBF β (Core-Binding Factor Beta), son partenaire hétérodimérique, compose le CBF (Core Binding Factor) et est essentiel à l'hématopoïèse définitive. Certaines altérations génétiques acquises de *RUNX1* sont fréquemment retrouvées dans les LAM et les SMD. Les mutations de *RUNX1* sont rares dans les NMP, mais sont significativement associées à une progression des NMP en leucémies dans 17 à 37% des cas^{124,132}.

IKZF1 (Ikaros Family Zinc Finger Protein 1) code pour IKAROS, un facteur de transcription, impliqué dans le remodelage de la chromatine lors de la lymphopoïèse normale, ainsi que dans la myélopoïèse et l'activité des CSH. Dans une cohorte de patients atteints de NMP, les délétions d'*IKZF1* (délétion commune du 7p) sont présentes dans moins de 1% des NMP en phase chronique, et est enrichie dans les patients atteints de leucémies post-NMP⁵⁷.

On trouve également de rares mutations d'**ETV6**, un gène membre de la famille des facteurs de transcription ETS. La partie N-terminale de cette protéine est impliquée dans les interactions protéine-protéine et la partie C-terminale permet la fixation à l'ADN. Les KO *ETV6* murins suggèrent qu'il est nécessaire à l'hématopoïèse normale et la maintenance du développement du réseau vasculaire. Ce gène est aussi connu pour être impliqué dans de nombreux réarrangements chromosomiques associés à des leucémies. *ETV6* interagit avec Grb2, FLI1 et HTATIP et peut former un gène de fusion avec *ABL1*.

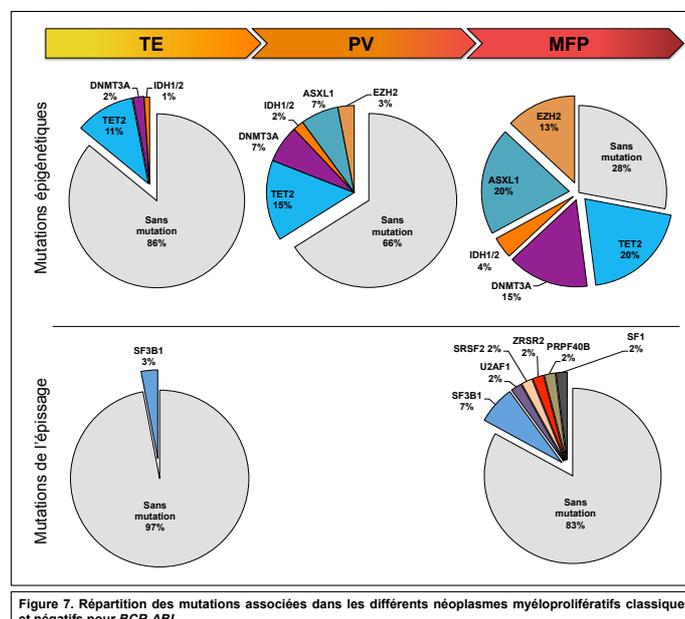


Figure 7. Répartition des mutations associées dans les différents néoplasmes myéloprolifératifs classiques et négatifs pour *BCR-ABL*.

Chapitre 3. Des protéines mutantes impliquées dans la voie JAK2/STAT

3.1 Propriétés générales de JAK2

JAK, Just Another Kinase ou *Janus* Kinase, qui fait référence au Dieu romain bifrons par la proximité des deux domaines kinases, est une famille de tyrosine-kinases non-réceptrices cruciales pour les récepteurs cytokiniques dépourvus d'activité kinase intrinsèque, qui servent d'intermédiaires à la transduction du signal de nombreuses réponses immunitaires et hématopoïétiques. En effet, le ligand cytokinique se fixe à son récepteur d'intérêt et induit une cis/transphosphorylation des JAKs, ce qui déclenche une cascade de signalisation en aval, induisant des signaux de survie cellulaire, de différenciation et de la prolifération. Le processus de phosphorylation est finement régulé et des anomalies peuvent mener au phénomène de phosphorylation constitutive qui dérégule la prolifération des cellules myéloïdes, principale caractéristique des NMP.

3.1.1 Domaines de JAK2 et interaction aux récepteurs de cytokines

JAK est une des dix familles identifiées comme tyrosine-kinases non-réceptrices, et est composée de quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Chez l'Homme, JAK1 est situé sur le chromosome 1 (1p31.3), JAK2 sur le chromosome 9 (9p24), JAK3 et TYK2 sur le chromosome 19 (19p13.1 et 19p13.2 respectivement). Ce sont des protéines de 120 à 140 KDa qui sont localisées sous la membrane plasmique, au niveau des endosomes et à proximité de leur récepteur d'intérêt. JAK1, JAK2 et TYK2 sont exprimées de manière ubiquitaire tandis que JAK3 est réduit à une expression purement hématopoïétique.

Concernant leur structure, les JAKs possèdent sept régions d'homologie bien définies : JH1-JH7 (**Figure 8**).



Figure 8. Domaines de la protéine JAK2. JAK2 code 7 régions d'homologie (JH) bien conservées au sein des 4 enzymes: JH1-JH7, et organisées en 4 domaines. JH1 correspond au domaine tyrosine kinase nécessaire à la phosphorylation de protéines cibles et activé après phosphorylation de la tyrosine 1007 (Y), JH2 correspond au domaine pseudokinase impliqué dans l'activation ainsi que l'auto-inhibition de la tyrosine kinase. Src-homology domain (SH2) et FERM forment une région d'interaction avec des récepteurs spécifiques. Y représente les différents résidus tyrosine.

Dans la partie C-terminale de JAK2, la région JH1 possède toutes les caractéristiques des tyrosine-kinases catalytiques : les résidus tyrosines dans la région de la boucle d'activation, le motif GXGXXG canonique dans la boucle de liaison à l'ATP, ainsi qu'un résidu conservé d'acide aspartique impliqué dans la réaction de phosphotransfert de la boucle catalytique. La région JH1 s'active après phosphorylation de la tyrosine 1007 (Y1007) située sur la boucle d'activation de la protéine JAK2¹³⁸.

Hautement homologue et attenant à JH1, la région JH2 est par nature catalytiquement inactif du fait du manque de résidus nécessaires à l'activité tyrosine-kinase : il s'agit du domaine pseudo-kinase de la protéine. Les études d'interaction de JH1 et JH2 révèlent un mécanisme d'autorégulation dans lequel JH2 inhibe l'activité tyrosine-kinase de JH1¹³⁹. Néanmoins, il a été montré que ce domaine possédait une activité kinase qui phosphoryle deux résidus régulateurs négatifs de JAK2 : Ser523 et Tyr570. Les mutations activatrices localisées dans la région JH2, telles que JAK2^{V617F}, réduisent en fait la phosphorylation de Tyr570 chez les patients, suggérant que la perte d'activité de JH2 contribuerait à la pathogénèse des NMP¹⁴⁰. De plus, la structure cristalline de JH2 révèle un changement de structure induit par JAK2^{V617F} : JH2 adopte une conformation de protéine kinase prototypique qui se lie au Mg-ATP, ce qui aide à la transphosphorylation de JH1, mimant ainsi la structure de JAK2 en présence de cytokine. Toutes ces observations ont pointé JH2 comme cible thérapeutique prioritaire dans le traitement des NMP⁵⁶.

Au niveau N-terminal de la protéine, les régions d'homologie JH3 et JH4 forment le domaine d'homologie SH2 (Src-homology-2) et les régions JH5 à JH7 forment le domaine FERM (Band-4.1, ezrin, radixin and meosin), tous deux impliqués dans la médiation des interactions avec les récepteurs cytokiniques ainsi que dans la localisation de MPL et d'EPO-R à la surface cellulaire^{141,142}.

La superfamille des récepteurs aux cytokines comprend deux types de récepteurs membranaires : type I et type II, tous deux dépourvus d'activité enzymatique dans leurs domaines cytosoliques.

Les récepteurs de type I partagent tous un résidu cystéine conservé ainsi que le motif WSXWS dans leur domaine extracellulaire. Ils sont ensuite subdivisés en quatre groupes sur la base de l'architecture de leur complexe activé : les homodimères (EPO-R, MPL, GCSF-R, GH-R, etc.), les hétérodimères ayant leur

chaîne β en commun (GM-CSF, IL-3, IL-5), les récepteurs multimériques qui possèdent la chaîne de signalisation gp-130 (IL-6R, IL-11R, etc.) et les hétérodimères ayant leur chaîne γ en commun (IL-2R, IL-4R, IL7R, etc.).

Les récepteurs de type II sont activés à la manière d'hétérodimères (IFN-R, IL-22R, IL-24R, IL-29R, etc.) (**Figure 9**).

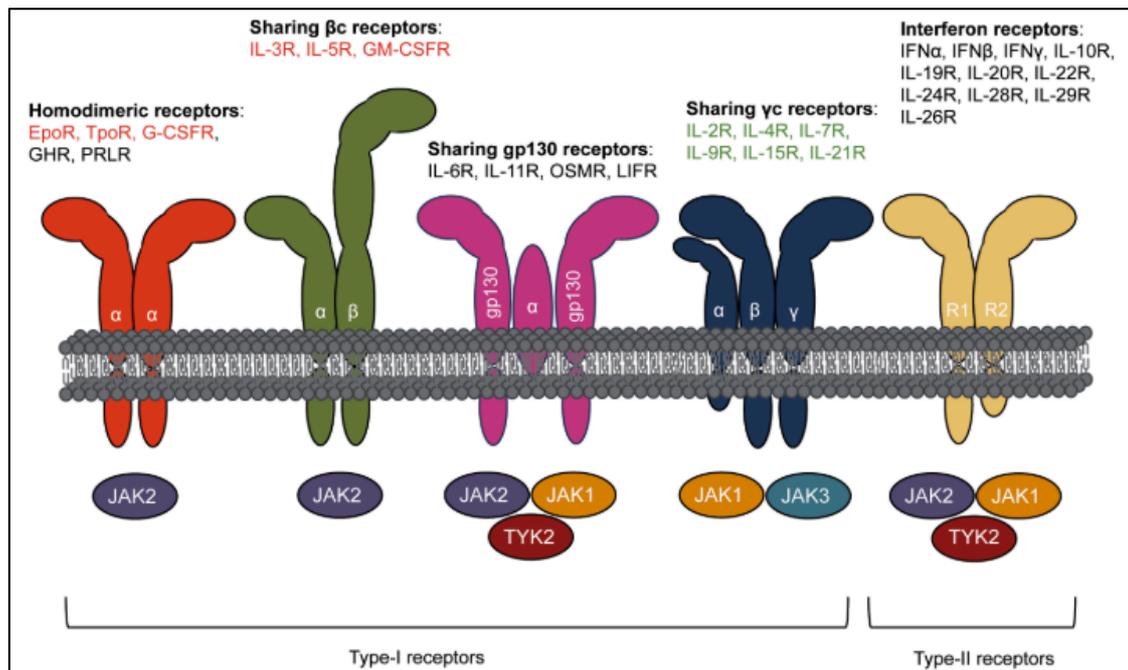


Figure 9. Les différents types de récepteurs cytokiniques. La superfamille des récepteurs cytokiniques se divise en type I et type II. Les récepteurs de type I se subdivisent en récepteurs homodimériques et en groupe de récepteurs partageant les sous-unités βc , gp130 ou γc . JAK2 est presque exclusivement activé par les récepteurs de type I homodimériques et βc tandis que ceux partageant gp130 et γc utilisent différentes JAKs. Les récepteurs de type II activent JAK1, JAK2 et TYK2 (Vainchenker W *et al*, F1000Research 2018).

Un seul JAK bien spécifique peut interagir avec chaque sous-unité des récepteurs cytokiniques, par le biais des séquences Box1, riche en prolines, et Box2, hydrophobe et chargée, au niveau des domaines cytosoliques des récepteurs où elles sont constitutivement présentes à proximité. Les cytokines interagissant avec ces différents récepteurs ont pour point commun une structure hélicoïdale à 4 hélices qui permet leur liaison au récepteur et l'activation de voies JAK/STAT.

La liaison cytokine-récepteur induit un changement dans la conformation du récepteur puis une cis/transphosphorylation des deux JAKs juxtaposées qui, à leur tour, provoquent la phosphorylation du récepteur. Une fois activé, le complexe récepteur-JAK promeut la phosphorylation de différents signaux de transduction et déclenche la cascade de signalisation en aval (**Figure 10**).

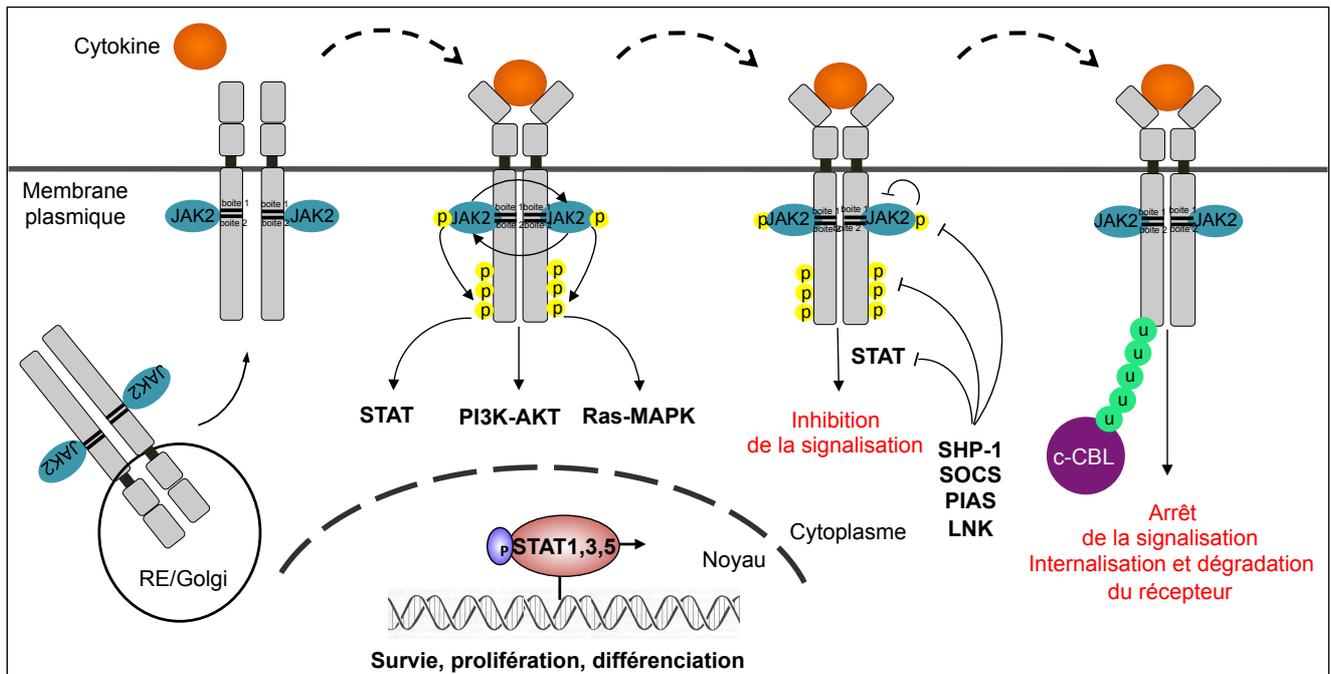


Figure 10. La signalisation induite par JAK2. JAK2 se fixe au récepteur cytokinique dans le réticulum endoplasmique dans le but de l'adresser à la membrane. La fixation du ligand sur son récepteur permet son activation soit sous forme dimérique soit par induction d'un rapprochement des formes monomériques qui induit alors une cis/transphosphorylation de JAK2 et de son récepteur. Une fois activé, le récepteur recrute et phosphoryle plusieurs transmetteurs de signaux qui vont permettre une survie, une prolifération ou une différenciation accrue par le biais des voies STATs, PI3K et MAPK. Par la suite, cette signalisation est régulée par déphosphorylation (SHP-1), par compétition de fixation aux STATs (SOCS, PIAS), par ubiquitination du récepteur (c-CBL) et par inactivation de JAK2 (LNK).

3.1.2 L'exemple du complexe TPO/MPL

La TPO humaine code un polypeptide de 353 acides aminés et est composée de deux domaines : une région N-terminale de 153 acides aminés possédant 25% d'identité avec l'EPO (domaine « EPO-like ») qui permet l'interaction avec le récepteur MPL et une région C-terminale de 179 acides aminés sans homologie avec d'autres protéines connues mais qui permet d'augmenter la demi-vie de l'hormone dans le plasma et d'aider au bon repliement de sa forme mature.

La TPO permet la différenciation mégacaryocytaire ainsi que la prolifération et la survie cellulaire des progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ *in vitro* en présence d'autres cytokines telles que l'IL-3 ou le SCF. Elle a donc un effet crucial sur la survie et la prolifération des CSH et permet un équilibre entre quiescence et prolifération cellulaire.

Le récepteur homodimérique de type I, MPL, est une protéine glycosylée de 70 KDa. Il est composé d'un domaine extracellulaire présentant deux motifs de récepteurs cytokiniques consécutifs comprenant un domaine « fibronectine III-like » qui contient 4 résidus cystéine ainsi que le motif WSXWS, d'un domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine intracytoplasmique contenant le motif box1 qui est pré-associé à JAK2 et TYK2. Ces protéines sont les chaperonnes de MPL nécessaires à son

expression et à son trafic à la membrane cellulaire, ainsi qu'à son activation (concernant JAK2). MPL contient aussi un domaine amphipatique (RWQFP) à la jonction des domaines transmembranaire et cytoplasmique qui joue un rôle dans la régulation négative du récepteur : son absence ou sa modification (mutants MPL^{W515X}) conduit à une activation constitutive du récepteur.

MPL est exprimé à la surface des CSH, des progéniteurs précoces, des mégacaryocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales. Son expression implique son trafic du réticulum endoplasmique vers la surface, soit par voie conventionnelle (internalisation, dégradation et recyclage du récepteur), soit par voie non-conventionnelle (sécrétions autophagiques)¹⁰⁶.

La voie classique de synthèse de MPL pour son transport à la membrane passe par le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi et les vésicules golgiennes où il va être correctement replié, mûré en particulier via ses sites de N-glycosylations en interagissant avec des protéines chaperonnes contenant des sites « lectine »¹⁰⁸. JAK2 et TYK2 jouent alors un rôle chaperonne dans l'adressage à la membrane de sa forme mature glycosylée¹⁴¹ et permettent aussi d'augmenter la stabilité de MPL en favorisant notamment son recyclage.

La fixation de la TPO à MPL induit un changement conformationnel du récepteur et permet le rapprochement des domaines intracellulaires de l'homodimère de MPL et la proximité de JAK2 et TYK2 qui va induire leur transphosphorylation. JAK2, alors actif, va permettre la phosphorylation du récepteur au niveau de résidus tyrosine tels que Y625 et Y630 du domaine intracellulaire qui vont servir de sites d'ancrage à de nombreux substrats tels que STAT1, 3, 5, permettant la transmission du signal et de site de reconnaissance par le complexe protéique AP2 (Adaptator Protein 2) qui joue un rôle dans l'endocytose induite par les puits de clathrine.

Le récepteur est ensuite internalisé, dégradé par la voie des lysosomes et du protéasome ou recyclé à la surface cellulaire. En effet, Hitchcock et al. montre que la moitié des récepteurs internalisés réapparaît à la surface après retrait de la TPO *in vitro*, ce qui suggère un recyclage ou une synthèse *de novo* de MPL¹⁰⁹.

Enfin, une voie non-conventionnelle par autophagie pourrait aussi permettre le trafic de MPL vers la surface cellulaire. En effet, MPL est retrouvé dans des compartiments à faible pH, colocalisant avec des marqueurs autophagiques tels que LC3, LAMP1 et Rab11 et la surexpression de GRASP55, un activateur de la voie non-conventionnelle par autophagie, induit une diminution de la forme mature de

MPL à la surface et une augmentation de sa forme hypoglycosylée¹⁰⁶. Ainsi, une partie des récepteurs MPL à la surface seraient immatures. Toutefois, ce travail a été réalisé dans des lignées leucémiques et la question reste entière à la surface des cellules primaires.

3.1.3 Régulation et rétrocontrôle négatif de la signalisation JAK2/STAT

L'intensité et la durée de signalisation médiées par JAK2 sont finement régulées par différents mécanismes dans le but d'empêcher une signalisation persistante qui dérégulerait la prolifération cellulaire et favoriserait une transformation maligne. De nombreuses protéines telles que des phosphotyrosine phosphatases (PTP), les SOCS, LNK, CBL ainsi que les protéines inhibitrices des STATs activés (PIAS) sont impliquées dans cette régulation négative de la signalisation médiée par JAK2.

La PTP SHP-1 (SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase), via son domaine SH2, se fixe à une tyrosine phosphorylée (pY429) d'EPO-R et déphosphoryle les JAK2 associées pour amorcer la fin du signal¹⁴³. Indépendamment de son domaine SH2, SHP-1 peut aussi se fixer directement à JAK2 et induire sa déphosphorylation¹⁴⁴.

Un autre mécanisme de contrôle de la signalisation cytokinique se fait *via* la famille des SOCS, notamment CIS, SOCS1 et SOCS3. CIS (Cytokine Inducible SH2 containing protein) est une cible de la voie JAK2/STAT. Elle contient un domaine SH2 qui permet la liaison aux tyrosines phosphorylées d'EPO-R et de l'IL3-R. Ainsi, CIS favorise le rétrocontrôle de STAT5 : son expression est induite par STAT5, puis module négativement l'activation de STAT5, résultant en une atténuation de la voie JAK/STAT¹⁴⁵. D'autre part, il a été montré que SOCS3 se lie directement à la Tyr401 du domaine cytosolique d'EPO-R et inhibe la prolifération dépendante de l'EPO et l'activation de STAT5 dans des lignées cellulaires Ba/F3-EPO-R et dans des progéniteurs érythroïdes. La Tyr401 est donc un site de fixation de STAT5¹⁴⁶. SOCS3 interagit aussi avec la Tyr1007 phosphorylée dans la boucle d'activation de JAK2 et inhibe son activité kinase¹⁴⁷. Ainsi, la liaison de SOCS3 à EPO-R et à JAK2 augmente son effet inhibiteur dans un contexte de signalisation cytokinique. Enfin, en réponse à l'IFN α , SOCS1 altère la mégacaryopoïèse en inhibant la signalisation induite par la TPO¹⁴⁸.

LNK (SH2B3) fait partie de la famille des protéines adaptatrices SH2B, impliquée dans la régulation négative de la signalisation des récepteurs cytokiniques. Son

domaine SH2 est essentiel à sa fonction inhibitrice. En effet, LNK inhibe la signalisation médiée par MPL et EPO-R en atténuant l'activation de JAK2 ce qui abolit les voies AKT, STAT et MAPK^{149,150} (**Figure 10**).

L'ubiquitination est un autre mécanisme de contrôle de la signalisation médiée par JAK2. Les CBL, E3 ubiquitine ligases, permettent la fixation d'ubiquitines aux récepteurs de cytokines, aux tyrosines kinases et à d'autres molécules afin de les recycler ou de les dégrader¹⁰⁷. A titre d'exemple, MPL est rapidement ubiquitiné sur ses deux résidus lysines K553 et K573 intracellulaires puis dégradé par les voies à la fois lysosomale et protéosomale¹⁵¹. Cette dégradation ouvre une voie annexe de régulation négative de la signalisation médiée par la TPO.

L'inactivation de médiateurs en aval, comme les STATs, peut aussi enrayer la signalisation de JAK2. En effet, PIAS1 et PIAS3, qui font partie de cette famille de gènes impliqués dans l'inhibition de la voie JAK/STAT, interagissent respectivement avec STAT1 et STAT3. Cette interaction PIAS-STAT empêche la fixation des STAT et donc l'activation de leurs gènes cibles¹⁵².

3.1.4 Contexte pathologique et activation constitutive de JAK2

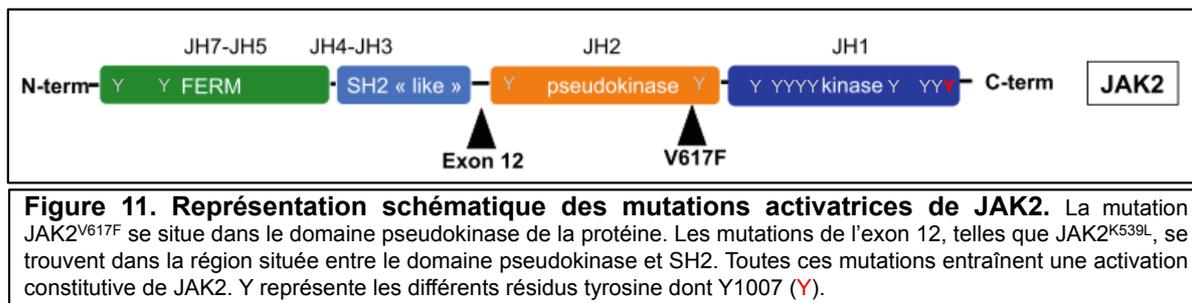
Deux principaux types d'altérations génétiques induisant une activité tyrosine kinase de JAK2 aberrante sont impliqués dans plusieurs hémopathies malignes : les réarrangements chromosomiques et les mutations ponctuelles.

En effet, plusieurs protéines aberrantes JAK2 de fusion induisent une transduction constitutive du signal chez des patients atteints de leucémies ou de lymphomes. Les mutations de JAK2 sont aussi rapportées dans certains rares cas de LLA et dans plusieurs hémopathies myéloïdes malignes, notamment sur ou autour du résidu arginine R683 du domaine JH1 de JAK2. La mutation JAK2^{V617F} est retrouvée dans 55% des patients atteints de TE ou de MFP, et dans 95% des patients atteints de PV^{52,53,54,55}. Elle est aussi rapportée dans moins de 10% d'hémopathies myéloïdes malignes rares^{153,154,155,54}. JAK1^{V658F} et TYK2^{V678F}, deux mutations homologues à JAK2^{V617F}, induisent aussi une activation constitutive, témoignant bien du fait que cette mutation libère le domaine JH1 de son auto-inhibition¹⁵⁶.

La surexpression de JAK2^{V617F} est capable de transformer des lignées cellulaires en présence de récepteurs homodimériques tels que EPOR, MPL ou G-CSF. La liaison de JAK2 à son récepteur cytokinique se fait via les domaines FERM et SH2 de la protéine et la mutation JAK2^{Y114A} dans FERM abolit cette interaction¹⁴¹. Dans les

lignées cellulaires Ba/F3-EPO-R, les doubles mutants $JAK2^{V617F/Y114A}$ n'induisent pas de signalisation constitutive, soulignant le fait que l'interaction physique de $JAK2^{V617F}$ à son récepteur est primordiale pour induire une signalisation constitutive¹⁵⁷, d'autant plus que les lignées cellulaires Ba/F3 JH1-JH2 avec $V617F$ ne présentent pas de signalisation constitutive¹⁵⁸.

Les PV $JAK2^{V617F}$ négatives possèdent d'autres mutants de JAK2, dus à des mutations dans l'exon 12, tels que $JAK2^{K539L}$ ¹⁵⁹. Ces mutants permettent de développer *in vitro* des lignées indépendantes aux facteurs de croissance et d'activer constitutivement la voie JAK/STAT, pouvant être contrebalancée par un traitement aux inhibiteurs de JAK (**Figure 11**).



Enfin, des mutations germinales de JAK2 sont retrouvées chez des familles atteintes de thrombocytoses héréditaires. Ainsi, la mutation $JAK2^{V617I}$, bien qu'elle n'induisse pas une indépendance aux cytokines, permet une hypersensibilité au G-CSF dans les $CD34^+$ et $CD33^+$, avec une phosphorylation augmentée de STAT3. De plus, un nombre plus important de CSH dans le sang périphérique est retrouvé chez ces patients^{160,161}. Enfin, notre équipe a découvert trois mutations germinales de JAK2 chez deux familles différentes atteintes de thrombocytoses héréditaires, au niveau des domaines pseudo-kinase ($JAK2^{R938Q}$) et tyrosine kinase ($JAK2^{R867Q}$, $JAK2^{S755R}$) de la protéine, mais sont résistantes aux inhibiteurs de JAK2 et d'HSP90¹⁶². Celles qui sont gain-de fonction faible comme $JAK2^{V617I}$ résultent en une activation constitutive et spécifique de l'axe TPO-MPL-JAK2 et en une pousse spontanée des progéniteurs mégacaryocytaires. D'autres mutations ont aussi été caractérisées chez ces patients comme $JAK2^{H608N}$ et $JAK2^{R564Q}$.

3.1.5 La protéine JAK2^{V617F} et ses effets sur la signalisation

Les tyrosines kinases activées sont une caractéristique commune aux NMP, tout comme la tyrosine kinase BCR-ABL dans le cadre des LMC. Les progéniteurs hématopoïétiques de patients atteints de NMP négatifs pour *BCR-ABL* présentent une hypersensibilité et une indépendance aux cytokines. En effet, JAK2^{V617F} induit une activation constitutive des voies de signalisation en aval de JAK2, à savoir JAK/STAT, PI3K et MAPK, entraînant alors une prolifération cellulaire incontrôlée.

3.1.5.1 Impact de JAK2^{V617F} sur la voie JAK2/STAT

La famille protéique des STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) est composée de sept membres : STAT1 à 4, STAT5-A, STAT5-B, et STAT6, qui sont impliqués dans différentes voies de survie cellulaire, de différenciation et de prolifération. Ils comportent plusieurs domaines fonctionnels conservés. Dans la région N-terminale, le domaine d'oligomérisation permet l'interaction avec d'autres protéines et la formation de tétramères de STATs. Le domaine de liaison à l'ADN (DBD) permet à ces facteurs de se lier spécifiquement à l'ADN. Le domaine SH2 permet le recrutement des STATs aux tyrosines phosphorylées du récepteur cytokinique activé, ou aux JAKs phosphorylées, et participe à la formation des dimères de STATs activées. Les éléments nécessaires à la régulation de l'activité des STATs se trouvent dans la région C-terminale : le domaine de transactivation (TAD) et le résidu tyrosine (Y) conservé pour la phosphorylation par les protéines JAKs. Ainsi, la stimulation par un facteur de croissance extracellulaire d'un récepteur cytokinique active JAK2 et ce complexe récepteur-JAK2 recrute les STATs via leur domaine SH2 et induit leur phosphorylation. Par exemple, les résidus tyrosine Y368, Y426, et Y56 d'EPO-R permettent l'activation de STAT3/5, STAT5 et STAT1/3, respectivement. Une fois phosphorylés, les STATs forment des complexes d'homodimères ou d'hétérodimères stables grâce aux interactions domaine SH2/résidu tyrosine phosphorylé et transloquent au noyau où ils induisent la transcription de différents gènes cibles en se liant à des séquences consensus de régulation spécifique (**Figure 12**).

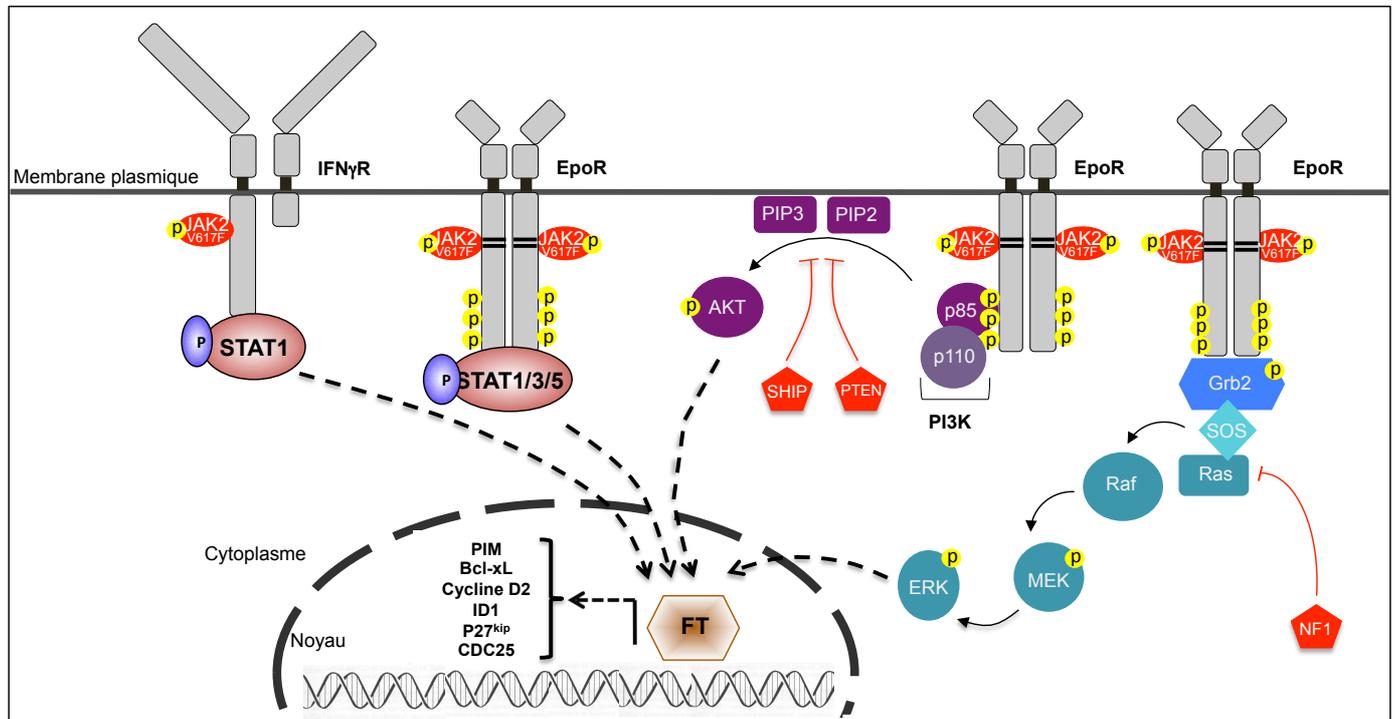


Figure 12. JAK2^{V617F} et l'induction de voies de signalisation aberrantes. La protéine JAK2^{V617F} se fixe à plusieurs récepteurs cytokiniques tels que celui de l'érythropoïétine (EpoR) et de l'interféron gamma (IFN γ R) et le complexe récepteur-JAK active constitutivement différentes cascades de signalisation, telles que JAK2-STAT, JAK2-AKT, JAK2-Ras-Raf-MEK-ERK qui induisent une expression altérée des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation des cellules myéloïdes. Les phosphatases PTEN (phosphatase with tensin homolog) et SHIP (SH2-containing 5'phosphoinositol phosphatase) régulent le niveau des PIP dérivés de PI3K et jouent un rôle crucial dans le phénotype des NMP dans les modèles murins. NF1 (neurofibromatosis 1) inhibe la voie RAS-Raf-MEK-ERK et est retrouvé muté chez des patients atteints de NMP. FT: facteurs de transcription.

Deux études utilisant des modèles murins rétroviraux et KI JAK2^{V617F} ont permis d'investiguer le rôle de STAT5 dans la pathogénèse des NMP JAK2^{V617F}. La première étude a visé à transplanter des CSH de la moelle de souris STAT5^{+/+}, STAT5^{+/-} et STAT5^{-/-} transduites JAK2^{V617F} à des souris receveuses sauvages. Les souris STAT5^{+/-} développent une maladie ressemblant à une PV JAK2^{V617F}, avec une leucocytose altérée. Les souris STAT5^{-/-} ne développent aucune caractéristique claire d'une PV JAK2^{V617F} mais sont capables de développer une maladie mimant une MF. Ces constatations suggèrent que STAT5 est essentiel au développement d'une PV JAK2^{V617F} mais indépendant à celui d'une MF¹⁶³. La deuxième étude a visé au croisement de souris KI JAK2^{V617F} avec des souris déficientes en STAT5. Ces souris ne développent pas de NMP –pas même de MF- et sont dépourvues de CEE, tandis qu'elles développent une maladie se rapprochant de la PV après « rescue » de STAT5¹⁶⁴. Ces deux études permettent de conclure à l'importance cruciale de STAT5 dans la pathogénèse des NMP.

L'importance de STAT5 dans l'érythropoïèse induite par JAK2^{V617F} semble s'opérer par différentes protéines d'aval, notamment BCL-XL, cycline D2, PIM, ID1 et CDC25.

De façon physiologique, BCL-XL montre une implication dans l'érythropoïèse. En effet, les souris *Stat5a*^{-/-}*Stat5b*^{-/-} développent une anémie embryonnaire sévère ainsi qu'une diminution du nombre de progéniteurs érythrocytaires due à une augmentation de l'apoptose, que l'on retrouve corrélée à une diminution de Bcl-xL dans des jeunes érythroblastes spléniques. De plus, une autre étude a démontré que STAT5 se fixe directement à la région promotrice de *Bcl-xL* et renforce la transcription dépendante de l'EPO : STAT5 régule donc bien le niveau transcriptionnel de Bcl-xL durant l'érythropoïèse^{165,166}. Enfin, les souris conditionnellement délétées pour Bcl-xL dans les cellules érythroïdes présentent aussi une anémie hémolytique¹⁶⁷. BCL-XL semble aussi très important dans la prolifération des cellules érythroïdes JAK2^{V617F}. En effet, durant la différenciation érythroïde, les progéniteurs érythrocytaires de PV présentent, même en l'absence d'EPO, une augmentation de l'expression de BCL-XL, protéine anti-apoptotique induisant la survie, contrairement aux progéniteurs érythrocytaires d'individus sains qui sont sujets à l'apoptose¹⁶⁸. De plus, un mutant constitutivement actif de STAT5 et la surexpression de BCL-XL dans les progéniteurs érythroïdes permettent leur pousse spontanée en absence d'EPO mimant l'effet de JAK2^{V617F}¹⁶⁹.

La cycline D2, régulateur majeur de la transition G₁/S du cycle cellulaire est surexprimée dans des lignées cellulaires Ba/F3 surexprimant JAK2^{V617F}¹⁷⁰. Le traitement aux inhibiteurs de JAK2 perturbe la croissance cellulaire en diminuant le niveau de cycline D2, de pSTAT5 et des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) ainsi qu'en augmentant p27^{kip}, inhibiteur du cycle cellulaire, dans des lignées cellulaires HEL (Human Erythroid Leukemia) exprimant constitutivement JAK2^{V617F}. Le blocage de la production de ROS par la N-acétylcystéine (NAC), induit aussi un arrêt en phase G1 des cellules HEL corrélé à des taux de cycline D2 diminués et de p27^{kip} augmentés via une diminution de la phosphorylation de STAT5. Dans une lignée cellulaire Ba/F3 dépendante de l'IL-3, une forme de STAT5 constitutivement active et inductible à la doxycycline est suffisante à l'induction de niveaux de ROS en absence d'IL-3, et en conséquence à l'augmentation de la cycline D2 et à la diminution de p27^{kip}. Ainsi, JAK2^{V617F} stimule le cycle cellulaire en régulant la cycline D2 ainsi que p27^{kip} par des processus d'oxydo-réduction¹⁷¹. L'importance des ROS a aussi été mise en évidence dans le modèle murin KI Jak2^{V617F} avec une diminution du développement de la maladie en présence de NAC¹⁷².

Les PIM sont des sérines-thréonines kinases qui induisent la progression du cycle cellulaire et inhibent l'apoptose. Leur activité, contrairement à d'autres kinases activées par phosphorylation, dépend de leur niveau d'expression. Elles sont régulées transcriptionnellement par les STATs et interviennent en amont de la famille anti-apoptotique BCL-2 et des régulateurs du cycle cellulaire. Dans les lignées cellulaires Ba/F3-EPO-R exprimant JAK2^{V617F}, on observe une activation constitutive de la voie JAK/STAT ainsi que des niveaux élevés de PIM1 et PIM2¹⁷³. Dans les lignées SET-2 mégacaryoblastiques humaines et positives pour JAK2^{V617F}, il a été montré que JAK2^{V617F} empruntait les voies PIM/BAD/Bcl-xL pour favoriser la survie cellulaire¹⁷⁴. Le traitement au vornistat, un inhibiteur des histones désacétylases, inhibe la prolifération et induit l'apoptose en bloquant la voie JAK/STAT et en diminuant l'expression de PIM1 dans la lignée HEL, tandis qu'il normalise les paramètres sanguins et réduit la splénomégalie dans le modèle murin KI JAK2^{V617F}¹⁷⁵. De plus, PIM1 est plus fortement exprimé dans les TE positives à JAK2^{V617F} que dans les TE négatives^{176,177}. La voie JAK/STAT joue donc un rôle crucial dans la pathogénèse des NMP, notamment par le biais de PIM1, effecteur important en aval de la kinase mutante JAK2^{V617F}.

ID1, une protéine inhibitrice de liaison à l'ADN appartenant à la famille des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice est un autre effecteur en aval de la signalisation JAK/STAT. Il agit comme un facteur de transcription dominant négatif en se liant à d'autres facteurs de transcription dans le but d'empêcher leur fixation à l'ADN et donc l'expression de leurs gènes cibles. ID1 est aussi connue pour être impliquée dans différentes voies de prolifération cellulaire ainsi que dans l'auto-renouvellement des CSH. Dans la lignée érythro-leucémique HEL connue pour exprimer JAK2^{V617F}, il a été montré que STAT5 se liait directement au locus d'ID1 et régulait son expression. L'inhibition de JAK2 réduit l'expression d'ID1, démontrant qu'il s'agit bien d'une cible en aval de la voie JAK/STAT. Enfin, l'expression d'ID1 est augmentée dans les BFU-E JAK2^{V617F} comparativement aux BFU-E négatives de patients atteints de PV et ID1 est une cible de la signalisation JAK2^{V617F}/STAT dans les progéniteurs érythroïdes¹⁷⁸.

CDC25A, un régulateur important du cycle cellulaire, est régulé positivement dans les lignées FDC-P1-EPO-R-JAK2^{V617F} ainsi que dans les cellules primaires humaines et murines exprimant JAK2^{V617F}. Son inhibition entraîne à la fois une différenciation érythroïde interrompue et un blocage des CEE chez les PV mais pas chez les sujets

sains. Il a été montré que JAK2^{V617F} ne régule pas CDC25A de manière transcriptionnelle mais de façon traductionnelle via STAT5 puisque son inhibition entraîne une diminution de pSTAT5, de l'expression de CDC25A ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation de e1FE α , un facteur de traduction régulant le niveau protéique de CDC25A. STAT5 phosphorylé joue donc un rôle important dans la prolifération érythroïde chez les patients JAK2^{V617F} en empruntant une nouvelle voie dans laquelle la signalisation constitutive de JAK/STAT cible le régulateur du cycle cellulaire CDC25A, via e1FE α , ce qui suggère un nouveau rôle de STAT5, traductionnel et dépendant de JAK2^{V617F}, dans la régulation du cycle cellulaire¹⁷⁹.

Même si STAT5 est d'une importance capitale dans la pousse érythroïde des cellules JAK2^{V617F}, ce dernier est capable d'activer d'autres STAT parfois de façon différentielle en fonction des lignées cellulaires. En effet, JAK2^{V617F} induit la phosphorylation de MPL et de G-CSF-R en absence de ligand, donc par voie de conséquence STAT1 et STAT3, et des niveaux différents d'activation des STAT peuvent être observés en fonction des cellules. Ainsi, STAT1 peut être activé chez les patients atteints de PV et TE mais de façon différentielle. En effet, dans les érythroblastes hétérozygotes JAK2^{V617F} issus de TE, les gènes de la voie de l'IFN- γ sont régulés à la hausse du fait d'une phosphorylation importante de STAT1, contrairement aux PV. Une phosphorylation augmentée de STAT1 dans les progéniteurs CD34⁺ JAK2^{WT} favorise un phénotype de TE tandis que l'inhibition de STAT1 dans les CD34⁺ hétérozygotes JAK2^{V617F} issus de PV réprime l'érythropoïèse et favorise la mégacaryopoïèse *in vitro*¹⁸⁰. Enfin, le KO de *Stat1* favorise un phénotype érythroïde induit par JAK2^{V617F} chez la souris au détriment du phénotype mégacaryocytaire¹⁸¹.

3.1.5.2 Impact de JAK2^{V617F} sur la voie PI3K-AKT

La PI3K (Phosphoinositide-3-Kinase) joue un rôle pivot dans la prolifération, la différenciation, la chimiotaxie, la survie, le trafic et l'homéostasie glucidique. Ces enzymes sont composées d'une sous-unité catalytique (p110) et régulatrice (p85) qui sont activées grâce au recrutement à la membrane via le domaine SH2 de p85 sur des motifs consensus YXXM phosphorylés après activation du récepteur cytokinique et produisent des lipides 3'-phosphoinositides comme le PIP3 (phosphatidylinositol-

3,4,5-trisphosphate) qui vont servir à recruter et à activer des protéines à domaine PH (AKT, PDK).

Les modèles murins déficients en Ship (SH2-containing 5'-phosphoinositol phosphatase) et en Pten (phosphatase with tensin homolog), deux phosphatases de PIP3, développent de nombreuses anomalies hématologiques comme l'anémie, la thrombocytopénie, la leucocytose, une hématopoïèse extra-médullaire et une altération de la fonction des progéniteurs, et ont permis la mise en avant de cette voie dans la pathogénèse des NMP^{182,183}. En effet, une activation anormalement forte de la voie PI3K-AKT induit une érythropoïèse dérégulée et une résistance à l'apoptose, caractéristiques de la PV¹⁸⁴.

De plus, dans les lignées Ba/F3, HeLa et FDCP-EPO-R, JAK2^{V617F} induit une activation constitutive de la voie PI3K-AKT¹⁸⁵, qui est aussi constitutivement active dans des modèles murins de NMP JAK2^{V617F}^{186,187}. Cette voie est activée par la fixation de la cytokine au récepteur mais aussi par l'activation aberrante et oncogénique de STAT5. Effectivement, dans un modèle murin rétroviral de transplantation de moelle, le mutant STAT5 constitutivement actif forme un complexe avec la sous-unité régulatrice p85 de PI3K et la protéine adaptatrice Gab2, induisant une activation leucémogène d'AKT, un intervenant crucial de la voie PI3K¹⁸⁸.

Toutes ces observations sont en faveur d'un rôle important de la voie JAK2/PI3K/AKT dans la pathogénèse des NMP (**Figure 12**).

3.1.5.3 Impact de JAK2^{V617F} sur la voie des MAPK

La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), comprenant RAS, RAF, MEK et ERK, permet la transmission de *stimuli* extracellulaires à l'intérieur de la cellule par le biais de cytokines, de facteurs de croissance et de facteurs mitogènes dans le but d'activer une multitude de voies impliquées dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Suite à sa phosphorylation, le récepteur cytokinique recrute une protéine d'amarrage contenant un domaine SH2 telle que GRB2 (Growth Factor Receptor-Bound Protein 2) qui forme un complexe avec SOS. Une fois que ce complexe est fixé au récepteur activé, SOS est phosphorylé et active RAS, une petite GTPase, qui agit à son tour sur trois molécules de signalisation en aval : RAF, MEK et ERK/MAPK.

L'érythropoïèse dérégulée observée chez les patients atteints de PV est associée à un profil d'activation de la voie RAS aberrant¹⁸⁴. De plus, la voie des MAPK est

constitutivement activée en absence de cytokine dans les cellules Ba/F3-EPOR-JAK2^{V617F}. Enfin, l'expression forcée du mutant RAS constitutivement actif induit une différenciation et une prolifération érythroïde anormale dans les études *in vitro* humaines et murines^{189,190}. RAS cible l'axe de signalisation MEK/ERK dans les cellules érythroïdes et un inhibiteur de MEK suffit à restaurer une érythropoïèse normale¹⁹¹. Les souris qui expriment l'oncogène KRAS développent un NMP foetal à pénétrance complète, caractérisé par une infiltration des tissus, une hypersensibilité aux facteurs de croissance, et une hyperprolifération myéloïde, soulignant l'impact leucémogène myéloïde rapide de KRAS¹⁹².

Des mutations oncogéniques « gain-de-fonction » de RAS sont retrouvées dans plusieurs hémopathies myéloïdes malignes tandis que son activation différentielle induite par des tyrosines kinases oncogéniques est impliquée dans l'apparition de phénotypes leucémiques. En effet, l'activation forte de RAS par BCR-ABL est capable d'inhiber l'érythropoïèse quand il est exprimé dans les cellules LSK murines, contrairement à JAK2^{V617F}¹⁹³. De plus, la prévalence de la mutation de RAS est de 7 à 13% des LAM post NMP⁴⁷, suggérant qu'elle coopère avec d'autres mutations pour promouvoir les leucémies en fournissant des signaux additionnels de survie et de prolifération cellulaire.

Enfin, des études de profils génétiques de patients ont montré que NF1, un régulateur négatif de RAS, est retrouvé muté ou tronqué, particulièrement chez les patients atteints de MF post-TE ou post-PV^{194,118}.

En conclusion, la signalisation de JAK2^{V617F} via la voie MAPK joue un rôle capital dans la pathogénèse des NMP (**Figure 12**).

3.1.6 Fonction et localisation nucléaire de JAK2 ?

Le rôle crucial de JAK2 en tant qu'initiateur de cascades de signalisation cytoplasmique dans des contextes d'hématopoïèse normale et leucémogène est à présent bien défini. Toutefois, de nouvelles fonctions non-canoniques et nucléaires semblent s'ajouter à ses capacités oncogéniques.

Par microscopie confocale à immunofluorescence, la présence d'un groupe de protéines JAK2^{V617F} et JAK2^{WT} a été révélée dans le noyau de cellules hématopoïétiques. Dans les lignées K562, SET-2, UKE-2 et HEL, JAK2 activé phosphoryle la Tyr41 (Y41) de l'histone H3, ce qui inhibe HP-1 α (Heterochromatin

Protein 1alpha), un répresseur de la transcription qui se fixe habituellement au niveau de cette région de H3. Des CHIP (immunoprécipitation de chromatine) sur la lignée HEL ont montré que JAK2 régulait l'expression de l'oncogène LMO2 en excluant HP-1 α ¹⁹⁵. Ainsi, sa fonction nucléaire contribue à la leucémogénèse en favorisant l'expression de l'oncogène LMO2 via l'inhibition d'HP-1 α .

La kinase JAK2^{V617F} est aussi impliquée dans d'autres modulations oncogéniques d'ordre épigénétique. En effet, elle se fixe plus fortement à PRMT5 -une méthyltransférase qui diméthyle les résidus arginine des histones H2A, H3 et H4- que la protéine sauvage. Ainsi, elle phosphoryle PRMT5 et bloque l'interaction avec son cofacteur MEP50, ce qui altère son activité à méthyler son substrat. Dans les CD34⁺ de patients JAK2^{V617F}, on retrouve un taux élevé de pPRMT5 et des études fonctionnelles de knockdown de PRMT5 ont montré une augmentation de la formation de colonies érythroïdes tandis que sa surexpression empêchait le développement du phénotype, ce qui suggère que l'arrêt de l'activité de PRMT5 médiée par JAK2^{V617F} induit un phénotype myéloprolifératif¹⁹⁶. Bien que la localisation nucléaire de JAK2^{V617F} demeure controversée¹⁹⁷, il n'en est pas tant de sa capacité à détourner des régulateurs nucléaires en réécrivant sa propre empreinte épigénétique dans le but de faciliter la transformation leucémique (**Figure 13**).

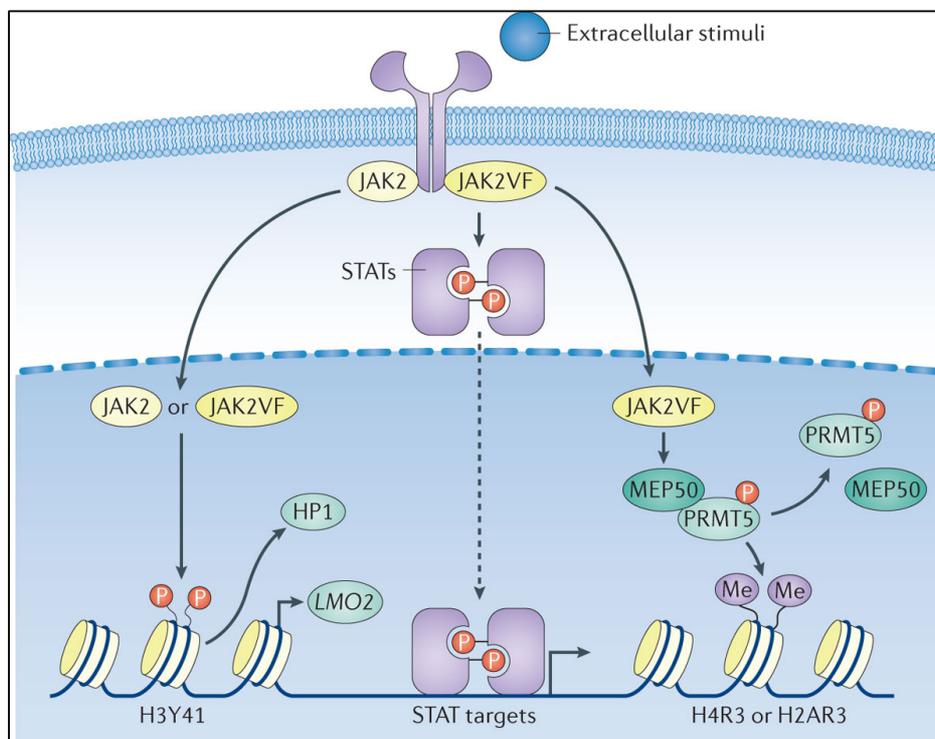


Figure 13. Rôle nucléaire de JAK2. JAK2 activée ou JAK2^{V617F} phosphoryle PRMT5 (protein Arg methyltransferase 5) et interrompt l'interaction avec son cofacteur MEP50 (methylosome protein 50) ce qui induit l'inhibition de la déméthylation d'histones médiée par PRMT5 et promeut alors l'expression génique. JAK2 activée ou JAK2^{V617F} peut aussi phosphoryler l'histone H3Y41 et exclure HP-1 α (heterochromatin protein 1 alpha) de la chromatine ce qui induit une dérèglement de l'hétérochromatine et une augmentation de l'expression génique, notamment de l'oncogène Lmo2 (pour revue: Liu, F *et al*, Nat. Rev. Cancer 2016).

JAK2^{V617F} agit aussi sur la stabilité du génome en contrôlant les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN et favorise la recombinaison homologe ainsi que la mutagenèse¹⁹⁸. Ce phénotype hyper-recombinant est lié à la fois à une inhibition de la fonction de P53 via une augmentation traductionnelle de MDM2 ainsi qu'à une génération de radicaux libres de l'oxygène créant des dommages oxydatifs sur l'ADN^{199,172}. JAK2^{V617F} est aussi responsable d'un grand stress réplicatif du fait de la collision des fourches²⁰⁰.

3.1.7 Fonction chaperonne de JAK2

En plus de déclencher des signaux en aval de récepteurs cytokiniques, JAK2 a aussi un rôle de protéine chaperonne dans le trafic d'EPO-R, de MPL et de G-CSFR à la surface cellulaire.

Les domaines FERM et SH2 de JAK2 interagissent avec EPO-R dans le réticulum endoplasmique, facilite sa maturation dans l'appareil de Golgi et favorise son expression à la surface cellulaire. Aussi, l'activité catalytique de JAK2 n'est pas nécessaire au trafic du récepteur, puisque FERM et SH2 suffisent¹⁴².

De la même manière, JAK2, et à moindre mesure TYK2, facilitent la localisation de MPL à la surface cellulaire en stimulant le recyclage et en augmentant la stabilité de la forme mature. Pour ce récepteur, et contrairement à l'EPO-R, le domaine JH1 de ces JAKs contribue aussi au trafic du récepteur vers la membrane¹⁴¹.

3.1.8 JAK2^{V617F} et les théories mécanistiques de pléiotropie phénotypique

Bien que la découverte de la mutation JAK2^{V617F} soit sans conteste cruciale pour la compréhension de la pathologie moléculaire des NMP négatifs pour BCR-ABL, les mécanismes d'implication de cette mutation dans trois phénotypes corrélés (TE, PV, MFP) demeurent incertains. Plusieurs théories ont alors vu le jour pour expliquer cette pléiotropie : le dosage génique, la signalisation du récepteur cytokinique, et le rôle des variations ou altérations génétiques antérieures ou postérieures.

3.1.8.1 Le dosage génique

Plusieurs études ont montré que la charge allélique de JAK2^{V617F} augmente de façon globale de la TE vers la MF en passant par la PV^{201,58} suggérant un dosage génique lié à l'évolution de la maladie. Cette théorie part du postulat que l'expression élevée de JAK2^{V617F} est corrélée au phénotype de PV ou de MF tandis que sa faible expression induit une TE. Des analyses de séquençage et de cytogénétique de compartiments myéloïdes matures ont en effet démontré que l'homozygotie de JAK2^{V617F} est présente dans environ 30% des patients PV du fait de la recombinaison mitotique et de la perte d'hétérozygotie que connaît le chromosome 9 (9pLOH)⁶⁰ (**Figure 14**). De plus, les études de Scott *et al* et Dupont *et al* montrent que les clones homozygotes JAK2^{V617F} sont pratiquement présents dans toutes les PV et absents des TE, qui présentent elles un profil plutôt hétérozygote. Toutefois, la présence de ces clones homozygotes chez des patients PV post-TE soulèvent deux hypothèses : soit ces patients possédaient déjà ces clones de manière minoritaire au stade TE, soit la transformation en PV est corrélée à l'acquisition de l'homozygotie de JAK2^{V617F}⁵⁹. Aussi, une charge allélique élevée de JAK2^{V617F} dans les granuleux corréle à une hyperleucocytose et à un niveau d'hémoglobine élevés dans les PV, ainsi qu'à une hyperleucocytose et à un chiffre élevé de plaquettes dans les TE.

Des études *in vitro* de progéniteurs érythroïdes en méthyl-cellulose ont démontré que JAK2^{V617F} déclenchait une hypersensibilité à l'EPO dépendante du dosage génique, et que l'homozygotie de JAK2^{V617F} induisait une indépendance à l'EPO. Dans ces conditions, JAK2^{V617F} permet un avantage sélectif prolifératif des cellules homozygotes de la lignée érythroïde⁸⁰. Ces résultats ont aussi été validés par un modèle iPSC présentant JAK2 hétérozygote et homozygote⁸⁷. Le phénotype de la PV peut donc être attribué au niveau de JAK2^{V617F}.

De façon un peu plus contradictoire avec les études précédentes, le groupe de Green a montré, en étudiant le statut mutationnel de progéniteurs érythroïdes de 77 patients, que les clones homozygotes JAK2^{V617F} prévalent dans les PV mais sont aussi retrouvés dans les TE à plus faible incidence. Cependant, les clones homozygotes ont un avantage prolifératif dans les PV qu'ils n'ont pas dans les TE, probablement du fait d'un mécanisme alternatif qu'ils gagnent dans la PV⁸⁶.

Cette relation entre le phénotype et le dosage allélique se retrouve aussi dans les modèles murins rétroviraux ou transgéniques. A titre d'exemple, le modèle transgénique JAK2^{V617F} humain au ratio 0,45 (faiblement muté humain comparé au

sauvage souris) récapitule un phénotype de TE –thrombocytose, légère neutrophilie et splénomégalie- tandis que le modèle au ratio 1 (fortement muté humain comparé au sauvage souris) développe une PV avec érythrocytose, thrombose, neutrophilie, de faibles niveaux d'EPO et une splénomégalie sévère²⁰².

Plus récemment, les modèles KI hétérozygote et homozygote JAK2^{V617F}, sous le contrôle de promoteurs endogènes, ont montré un développement vers un phénotype de PV, plus sévère toutefois pour le modèle homozygote avec des érythrocytose, leucocytose, thrombocytose et splénomégalie prononcées. Le phénotype de TE est retrouvé dans le KI hJAK2^{V617F} au ratio allélique humain/murin de 1:1⁹⁷, soulignant le fait que JAK2^{V617F} humain doit être moins efficace dans un contexte murin et que des niveaux d'expression plus élevés sont nécessaires au développement d'une PV.

Au final, le niveau d'expression de l'allèle JAK2^{V617F} reflète bien la diversité de phénotype des NMP.

3.1.8.2 Le différentiel de signalisation des STATs

Des seuils d'activation différentielle des récepteurs cytokiniques peuvent expliquer l'implication de lignages si différents au sein des NMP. En effet, l'étude de la phosphorylation des STATs chez des patients PV, TE et MFP révèle des tendances de phosphorylation spécifiques de STAT3/STAT5 : une pSTAT3 légèrement augmentée et une pSTAT5 réduite dans la TE, des pSTAT3 et 5 augmentées dans la PV et toutes deux réduites dans la MFP²⁰³ (**Figure 14**). Ce dernier résultat est d'autant plus surprenant qu'on s'attendrait à une signalisation des STATs plus importante dans un contexte de MFP. Ainsi, la signalisation médiée par MPL serait plus sensible à des faibles niveaux de JAK2^{V617F} induisant une phosphorylation de STAT3 tandis que l'EPO-R serait activé à des niveaux plus élevés de JAK2^{V617F} entraînant une phosphorylation de STAT5 (**Figure 14**). Ce différentiel de phosphorylation des STATs expliquerait alors les différentes caractéristiques biologiques rencontrées, d'autant que STAT3 joue un rôle important dans la mégacaryopoïèse²⁰⁴. Il est aussi impliqué dans des réponses inflammatoires, particulièrement dans les monocytes et macrophages, et son activation serait responsable d'une stimulation intense de cytokines²⁰⁵.

Le rôle des STAT est très important dans le phénotype de la maladie puisque les souris déficientes en STAT5 ne peuvent pas développer de PV induite par JAK2^{V617F},

et le développement de MFP reste controversé. Aussi, comme décrit précédemment, STAT1 peut être activé de façon différentielle chez les patients atteints de PV et TE et son défaut favorise un phénotype érythrocytaire au détriment du phénotype mégacaryocytaire^{180,181} (**Figure 14**).

3.1.8.3 Les variations génotypiques liées à l'individu

JAK2^{V617F} active la signalisation des récepteurs cytokiniques de type I dans les NMP, et la variation génotypique de JAK2 et/ou des récepteurs peut influencer leur interaction et donc le phénotype de la maladie. En ce sens, le génotypage de SNP (single nucleotide polymorphism) de gènes impliqués dans la voie JAK/STAT tels que JAK2, MPL, EPO-R et GCSF-R a révélé certaines associations génotype-phénotype chez les patients atteints de NMP. Ainsi, trois SNP de JAK2 (rs7046736, rs10815148 et rs12342421) sont associés à la PV et à la TE mais pas à la MFP, tandis que 3 SNP de JAK2 (rs10758669, rs3808850 et rs10974947) et un SNP d'EPO-R (rs318699) sont liés à la PV mais pas aux autres NMP. Aussi, certains haplotypes de JAK2 sont spécifiques de la PV. Toutes ces observations permettent de conclure à une association certaine entre des SNP ou des haplotypes de JAK2 et le phénotype de la maladie, bien que ce soit plus controversé concernant les récepteurs cytokiniques de type I²⁰⁶. D'autres SNP comme *HBSL1-MYB*, *TERT* ou *ERCC2* changent le phénotype de la maladie et son évolution²⁰⁷.

Concernant les modèles rétroviraux murins, l'expression de JAK2^{V617F} induit une érythrocytose et une forte leucocytose avec fibrose médullaire dans les souris Balb/c tandis qu'elle entraîne une érythrocytose et une leucocytose légère dans les souris C57Bl/6, suggérant que la souche contribue au développement de la maladie^{208,209}.

Ainsi, les variations génétiques de l'hôte joueraient un rôle décisif dans la pléiotropie de la maladie, tout en partageant le même allèle muté. De plus, Il a été montré que l'âge favorise le développement et l'expansion des clones homozygotes JAK2^{V617F} et que le genre module les conséquences phénotypiques de cette homozygotie²¹⁰.

3.1.8.4 Des évènements antérieurs et postérieurs à JAK2^{V617F}

La mutation JAK2^{V617F} peut collaborer avec des évènements génétiques additionnels pré- ou post-JAK2^{V617F} qui seraient spécifiques de chaque phénotype.

Tout d'abord, des études quantitatives de JAK2^{V617F} et clonales d'inactivation du chromosome X ont relaté la présence d'une granulopoïèse clonale corrélée au ratio

de l'allèle $JAK2^{V617F}$ dans la plupart des PV mais pas dans les TE et MFP, suggérant que cette mutation est suffisante à l'induction d'une hématoïèse clonale dans la PV mais pas dans les autres NMP. Aussi, quelques TE et PV à la granulopoïèse clonale abritent un sous-clone $JAK2^{V617F}$: $JAK2^{V617F}$ est donc acquis sur un terrain génétique déjà clonal. A l'inverse, certaines TE et MFP, à l'hématoïèse clonale, n'étaient pas mutés $JAK2^{V617F}$, ce qui met en avant la présence d'une autre altération génétique qui phénocopie $JAK2^{V617F}$ ^{211,212} (**Figure 14**). Ces études poussent à penser qu'un événement additionnel est responsable de cette émergence et de cette expansion clonale, et que $JAK2^{V617F}$ est un événement génétique acquis plus tardivement dans la progression de la maladie. Sur une étude de 17 patients atteints de NMP $JAK2^{V617F}$, 5 se sont transformés en LAM $JAK2^{V617F}$ et 9 en LAM non-mutées $JAK2^{V617F}$. Des études clonales montrent la présence d'un ancêtre commun aux NMP $JAK2^{V617F}$ et aux LAM non-mutées $JAK2^{V617F}$, témoignant de l'antériorité de l'événement génétique additionnel et de la disparition du sous-clone $JAK2^{V617F}$ au moment de la transformation²¹³.

Plus tard, les données de séquençage sur les patients ont permis de montrer que l'expansion clonale pouvait être due à des mutations de *TET2* ou de *DNMT3A*¹¹⁹. Ces mutations peuvent apparaître avant ou après $JAK2^{V617F}$ et changer le phénotype de la maladie. Quand elles précèdent $JAK2^{V617F}$, elles induisent un phénotype de TE tandis qu'elles sont corrélées à un phénotype de PV¹²⁵ lorsqu'elles surviennent après. Les mutations d'*EZH2* peuvent également changer le phénotype de la maladie et participer à l'initiation. En effet, les KO *Ezh2* montrent que les souris $JAK2^{V617F}$ diminuent leur polyglobulie et développent une MF accélérée^{128,129}.

L'haplotype 46/1, facteur prédisposant des NMP, a été découvert en 2009 par trois différentes équipes. Il s'agit d'une séquence de 280 Kb du chromosome 9p composée de trois gènes : *JAK2*, *INSL6* et *INSL4*. Il est aussi appelé haplotype « GGCC » du fait de ses quatre SNP (rs3780367, rs10974944, rs12343867 et rs1159782) localisés sur *JAK2*, en déséquilibre de liaison et qui ont donc tendance à être transmis ensemble. Des analyses d'haplotypes du chromosome 9 et plus largement de SNP du génome entier ont révélé que l'haplotype 46/1 était plus prévalent dans les NMP que dans la population globale et que $JAK2^{V617F}$ est acquise préférentiellement en *cis* sur cet haplotype^{214,215,216}. En revanche, on ne connaît pas l'effet de cet haplotype sur le développement de la maladie car aucune étude fonctionnelle n'a pour l'instant été réalisée. Au final, ces observations suggèrent que

l'haplotype 46/1 peut prédisposer aux NMP indépendamment de JAK2^{V617F} et conférer un environnement favorable à l'acquisition de la mutation JAK2^{V617F}.

Enfin, l'étude des cas familiaux de NMP présente la preuve la plus marquante d'événements antérieurs à JAK2^{V617F}. En effet, la présence de TE, PV et MFP JAK2^{V617F} mais aussi de LMC BCR-ABL et de mastocytoses mutées KIT dans une même famille témoigne d'une altération moléculaire commune en amont qui prédispose cette famille au développement de NMP. L'absence de JAK2^{V617F} dans les cellules T et B de ces patients montre que la mutation est acquise dans ces familles. Le risque accru de développer un NMP pour les parents du premier degré témoigne de la présence d'un facteur de susceptibilité commun qui prédispose la famille au développement de la maladie^{217,218,219}. Ces études fournissent suffisamment d'indices pour penser que l'acquisition d'un événement s'opère avant JAK2^{V617F}, dont peuvent émaner divers phénotypes en collaboration avec JAK2^{V617F}. Enfin, du fait de son effet sur la mutagenèse et de l'instabilité génétique induite par JAK2^{V617F} elle-même¹⁹⁸, on peut penser qu'elle induit des anomalies additionnelles qui vont pouvoir participer à l'hétérogénéité et à la progression des NMP.

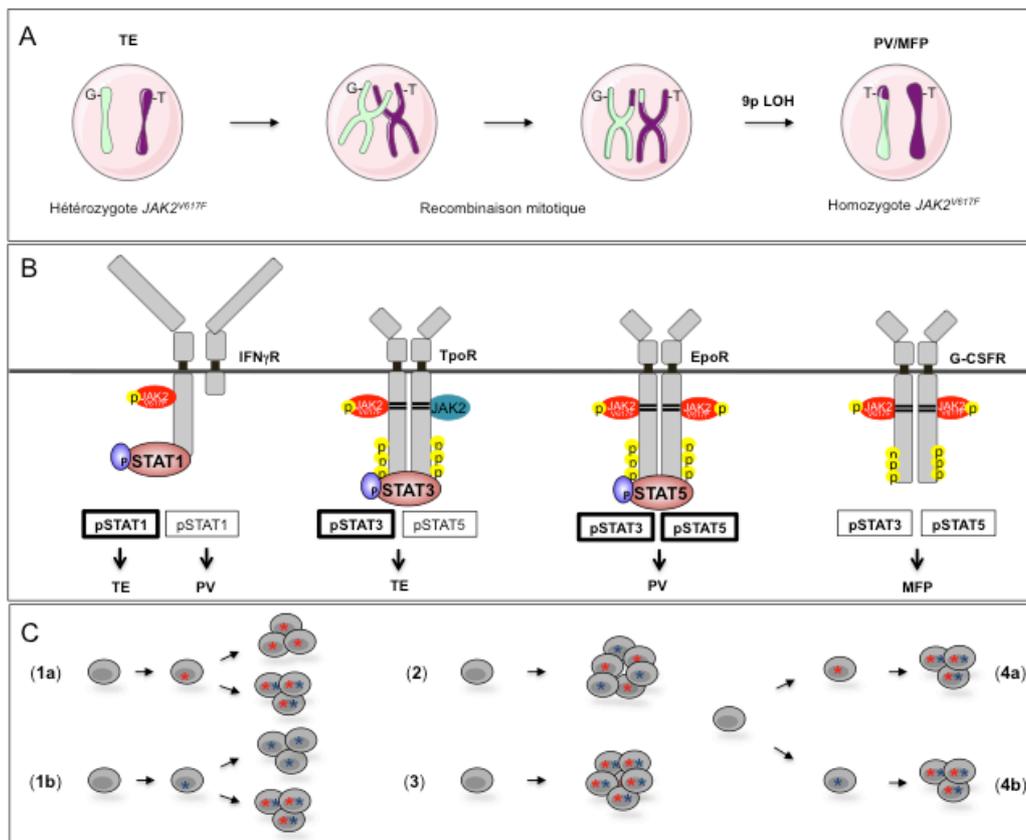


Figure 14. Les hypothèses de pléiotropie phénotypique liée à JAK2^{V617F}. Selon la théorie du dosage génique (A), l'expression de JAK2^{V617F} à l'état hétérozygote induit un phénotype de TE tandis que la perte d'hétérozygotie du bras court du chromosome 9 après recombinaison mitotique induit l'homozygotie de JAK2^{V617F} et la perte de l'allèle sauvage conduit à une signalisation accrue de JAK2 et à une aggravation du phénotype de la maladie (PV/MFP). Selon la théorie du différentiel de signalisation des STATs (B), le rapport d'activation entre STAT1, STAT3 et STAT5 par le biais des récepteurs fixant JAK2 induit une hyperprolifération myéloïde spécifique d'un lignage produisant différents phénotypes de maladie. Enfin, des variations génétiques de l'individu telles que les haplotypes de JAK2 et les SNP de récepteurs spécifiques ou des événements mutationnels antérieurs ou postérieurs à JAK2^{V617F} (C) peuvent contribuer à la diversité phénotypique des NMP JAK2^{V617F}. L'astérisque rouge correspond à JAK2^{V617F} et la bleue correspond à X altération génétique. JAK2^{V617F} peut apparaître en premier et X peut ensuite coexister dans un sous-groupe de cellules (1a) ou vice-versa (1b). JAK2^{V617F} et X peuvent apparaître en même temps dans des clones indépendants (2) ou dans les mêmes clones (3). Enfin, JAK2^{V617F} peut précéder X (4a) ou vice-versa (4b).

3.2 Propriétés générales de CALR

La Calréticuline (CALR) est une protéine chaperonne de 46 KDa, soluble dans la lumière du réticulum endoplasmique et hautement conservée au sein des espèces. Elle permet, avec la Calnexine (CNX), un maintien des protéines non totalement repliées dans le réticulum et intervient dans la régulation intracellulaire et intraréticulum du calcium, ainsi que dans la cicatrisation et dans l'immunité lorsqu'elle est extracellulaire.

3.2.1 CALR, une protéine du réticulum endoplasmique (RE)

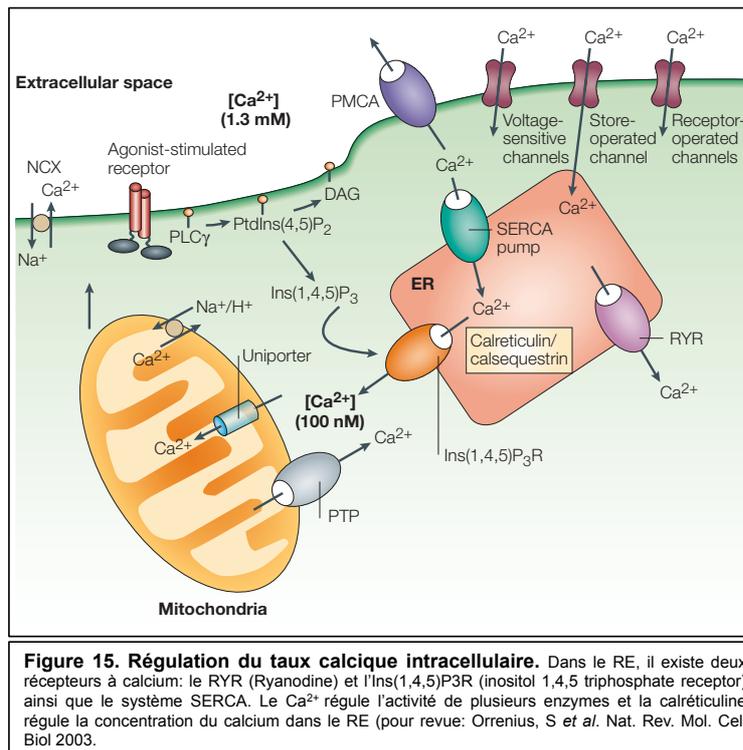
Le RE représente le site majeur de synthèse des glycoprotéines sécrétées et membranaires qui seront ensuite transférées à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique par le biais de vésicules.

En effet, la protéine nouvellement synthétisée dans le RE subit des modifications post-traductionnelles reconnues par des lectines chaperonnes qui contrôlent sa structure tridimensionnelle et lui donnent l'opportunité de poursuivre son chemin vers l'appareil de Golgi ou d'être redirigée vers les voies de dégradation du protéasome en cas de problème. Différentes familles de chaperonnes moléculaires ont été décrites dans le RE, notamment les HSPs (Heat Shock Proteins), les lectines et les PDI (Protéines Disulfure Isoméras) telles que ERp57²²⁰ mais les deux chaperonnes fondamentales du RE sont la CALR, soluble et résidente en son sein, et la CNX, transmembranaire. Elles participent toutes deux au contrôle de la qualité des glycoprotéines sécrétées et membranaires. La calréticuline peut contrôler et potentiellement interagir avec toutes les protéines N-glycosylées bien que la liste détaillée de tous ses clients ne soit pas réellement connue.

Le RE joue également un rôle important dans l'homéostasie calcique cytosolique puisqu'il s'agit du lieu principal de stockage du calcium (Ca^{2+}), une molécule de signalisation jouant un rôle crucial dans la transcription, l'exocytose, le métabolisme, la fertilisation, la prolifération mais aussi la contraction musculaire²²¹. Le Ca^{2+} est présent en quantité abondante dans la lumière du RE et son stockage joue un rôle essentiel dans sa signalisation et notamment dans la synthèse des lipides et des protéines. En effet, lorsque $[\text{Ca}^{2+}]$ varie dans la lumière du RE, le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi se détériore, des inhibitions de transport des molécules à

travers le port nucléaire ont lieu et les fonctions des chaperonnes sont perturbées. D'autre part, toute perturbation de son stockage ou tout défaut de libération du Ca^{2+} peut provoquer l'activation de cascades transcriptionnelles et traductionnelles qui régulent, dans le RE, les chaperonnes moléculaires responsables des repliements protéiques ainsi que les protéines impliquées dans les voies de l'apoptose, du stress et du système ERAD (ER-associated degradation pathway).

La signalisation et l'homéostasie calciques sont régulées dans le RE par les récepteurs InsP3R (Inositol-1,4,5-trisphosphate) et RyR (de la Ryanodine) qui régulent son export tandis que le stock calcique du RE est contrôlé par le système SERCA (pompe Ca^{2+} /ATPase). Le calcium exerce une régulation allostérique sur de nombreuses enzymes et protéines du RE en permettant notamment le rétrocontrôle de la régulation de InsP3R, de RyR et du système SERCA (**Figure 15**). CALR, quant à elle, est la protéine majeure de liaison au Ca^{2+} du RE et permet donc de réguler la concentration calcique en son sein.



3.2.2 Fonctions de la CALR

Il a été décrit de nombreuses fonctions de CALR, notamment dans l'immunité anti-cancéreuse où son expression à la surface des cellules constitue un signal favorisant leur phagocytose, mais aussi dans l'adhésion cellulaire ou dans la réparation

tissulaire^{222,223}. Toutefois, ses deux fonctions principales au sein du RE sont celles de chaperonne moléculaire et de régulateur calcique.

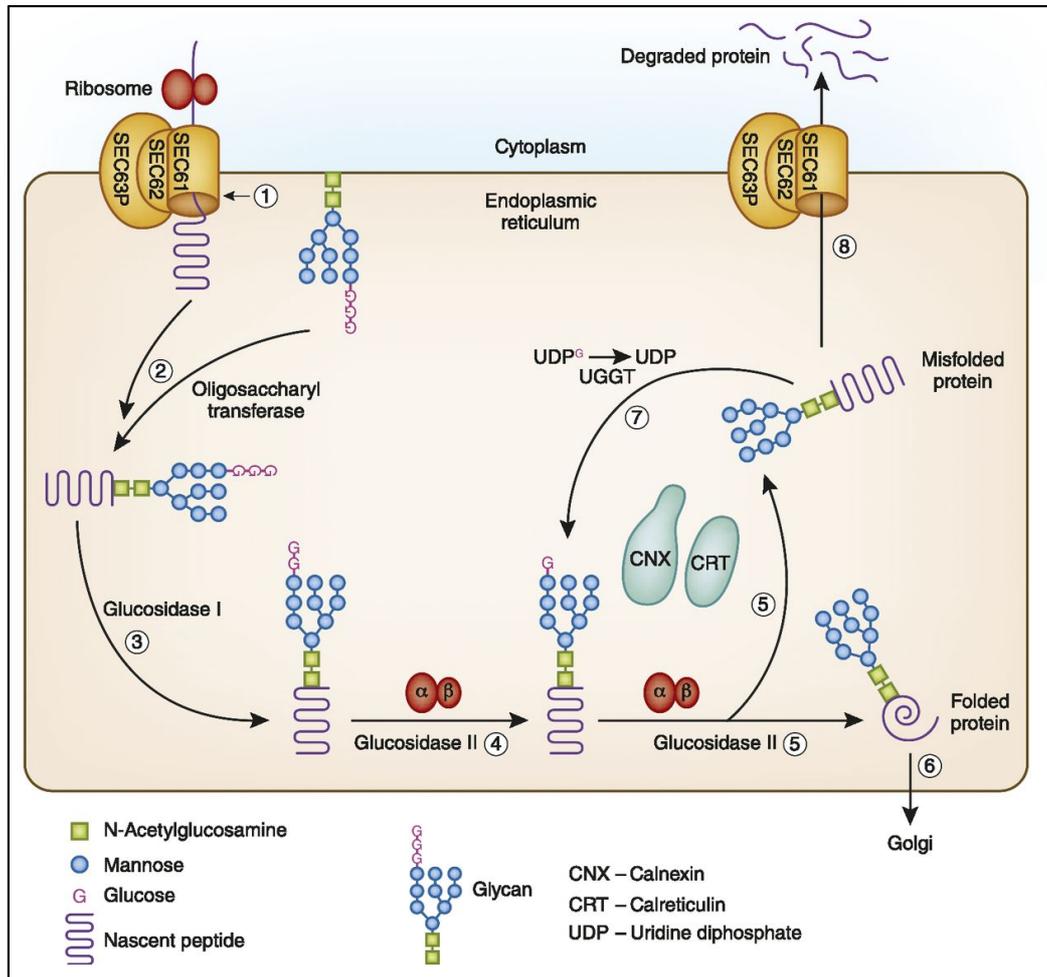


Figure 16. N-glycosylation et le cycle CALR/CNX. Les protéines néosynthétisées dont la conformation est correcte sont exportées vers l'appareil de Golgi par le biais de la calréculine (CALR ou CRT) et de la calnexine (CNX) qui font office de contrôle qualité. En cas de problème, un système de recyclage par reglycosylation faisant intervenir l'UDP-glucose-glycoprotéine-glycotransférase (UGGT) permet de recommencer le processus de repliement. Toutefois, en cas d'échec, les protéines sont alors dégradées par le système ERAD.

En effet, une fois qu'une protéine native nouvellement synthétisée rentre dans la lumière du RE, par reconnaissance d'une séquence spécifique, l'oligosaccharide pré-assemblé $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ est ajouté sur les groupements $-\text{NH}_2$ du résidu asparagine (N) situés dans le motif $-\text{N-X-S/T}-$ de la protéine. Celle-ci, alors N-glycosylée, est par la suite modifiée par les glucosidases I et II, qui enlèvent les deux glucoses –en position 3 et 2 respectivement- du polysaccharide N-lié qui se transforme alors en $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. La protéine, à présent monoglucosylée, est reconnue par CALR et/ou CNX, qui favorisent son repliement. Dès que la protéine a atteint sa conformation mature, le glucose restant est éliminé par la glucosidase II et

la protéine est finalement libérée de sa chaperonne et transportée vers le Golgi. Si elle n'est pas dans son état de repliement définitif, la protéine est alors reconnue et reglucosylée en position 1 par UGGT (UDP-glucose Glycoprotéine Transférase) et de nouveau fixée par la chaperonne –on parle de cycle CALR/CNX- jusqu'à ce qu'elle soit correctement repliée. ERp57 est une oxydoréductase physiquement associée à CALR ou CNX, qui catalyse la formation et la rupture des ponts disulfure pour faciliter le repliement des protéines. Les protéines ayant une interaction prolongée avec CALR ou CNX sont identifiées comme "mal repliées" et sont redirigées vers la voie de la dégradation associée au RE : la voie ERAD (**Figure 16**). Enfin, en se liant au calcium, CALR joue un rôle dans l'homéostasie calcique et dans son stockage dans le RE. En effet, une variation de $[Ca^{2+}]$ peut affecter le bon repliement de CALR: selon que la $[Ca^{2+}]$ soit faible ou forte, CALR aura une forme plus compacte ou au contraire plus relâchée²²⁴, ce qui peut jouer un rôle dans sa rétro-translocation vers le cytoplasme²²⁵.

3.2.3 Domaines de la CALR

CALR se compose de 3 domaines : un domaine globulaire en N-terminal, un domaine P riche en proline et un domaine C-terminal (**Figure 17**). Le domaine N est un domaine globulaire qui contient un site de liaison Zn^{2+} qui assure surtout l'interaction avec des molécules glycosylées et avec d'autres protéines dans le but d'exercer l'activité chaperonne permettant de maintenir les protéines néo-synthétisées non totalement repliées dans le RE. En effet, ce domaine, en coopération avec le domaine P, lie les résidus N-glycosylés des glycoprotéines, en particulier le $Glc_1Man_9GlcNAc_2$. II. Ce domaine forme une structure stable et rigide qui résiste à la protéolyse en présence du calcium.

Le domaine P, riche en proline, contient des sites de liaison au Ca^{2+} de haute affinité, mais de faible capacité. Ce domaine est caractérisé par la présence de trois copies de deux séquences répétées d'acides aminés selon la configuration «111222»²²⁶. Ces répétitions d'acides aminés peuvent jouer un rôle d'union des oligosaccharides contribuant ainsi à la fonction de chaperonne de CALR mais sont aussi impliquées dans la formation du complexe entre CALR et l'enzyme de repliement du RE, l'oxydoréductase ERp57, qui catalyse la formation des ponts disulfure entre les cystéines des protéines néo-synthétisées²²⁷.

Enfin, le domaine C contient de nombreux résidus chargés négativement qui induisent la liaison du calcium avec une faible affinité mais une forte capacité, ce qui permet à CALR d'être un acteur majeur de la régulation de la concentration calcique cytosolique. Aussi, on y retrouve le motif tétra-peptidique KDEL (Lysine, Aspartate, Glutamate, Leucine), un signal de rétention dans le RE, qui empêche la CALR d'être sécrétée et l'oblige à résider dans le RE.

3.2.4 Les mutants CALR et leur implication dans les NMP

Fin 2013, de nouvelles mutations impactant les NMP, et plus particulièrement les TE et les MFP, ont été découvertes par deux équipes européennes dans l'exon 9 du gène CALR^{73,74}.

Toutes ces mutations aboutissent au remplacement de la queue C-terminale sauvage, chargée négativement, par une nouvelle queue chargée positivement et commune à tous les mutants ainsi qu'à la perte du motif KDEL. La mutation de type 1 (délétion de 52pb) conserve une séquence sauvage plus restreinte que la mutation de type 2 (insertion de 5pb), et donc un nombre plus faible de sites de fixation du Ca²⁺ (figure 17).

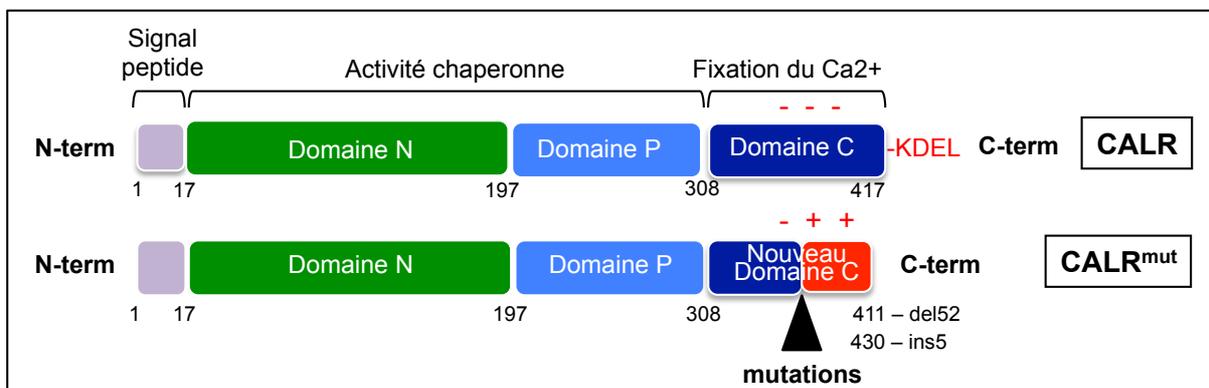


Figure 17. Structure de la protéine CALR et représentation de ses mutations activatrices. CALR est une protéine chaperonne du RE qui permet le bon repliement des protéines néosynthétisées et N-glycosylées via ses domaines N et P et intervient dans la régulation calcique via son domaine C. Toutes les mutations de la CALR (dont les plus fréquentes sont del52 et ins5) provoquent la transformation de la queue sauvage chargée négativement en une nouvelle queue C-terminale chargée positivement ainsi qu'à la perte du motif de rétention dans le RE (motif KDEL).

Dans la lignée cellulaire Ba/F3 mutée CALR, dépendante de l'IL3 mais surexprimant MPL, il a été montré que la mutation de type 1 favorisait une prolifération cellulaire en absence de cytokines et une forte activation de STAT5, ce qui suggère un rôle initiateur du phénotype myéloprolifératif de CALR^{mut}. De plus, le traitement au

ruxolitinib, inhibiteur de JAK2, empêche la croissance cellulaire autonome, ce qui témoigne d'une implication probable de la voie JAK2/STAT5⁷³. L'activation de cette voie de signalisation ainsi que l'indépendance –ou hypersensibilité- aux cytokines ont été confirmées sur les modèles cellulaires UT-7, Ba/F3-MPL transduits ainsi que sur des lignées éditées par CRISPR^{94,95,228,229,230}. Aussi, les études transcriptomiques concordent avec une activation de cette voie de signalisation chez les patients CALR^{mut}²³¹. Ainsi, bien que CALR ne soit pas impliquée directement dans la voie JAK/STAT, ces mutations semblent mettre en jeu des mécanismes oncogéniques similaires aux mutations JAK2^{V617F} et MPL^{W515X}.

Au-delà de la voie JAK/STAT, l'activation de la voie des MAPK semble permettre un certain avantage à la différenciation mégacaryocytaire conféré par CALR^{mut}²³², et la voie PI3K/AKT est aussi mise en jeu, à moindre mesure^{93,228,233}. Ces effets fonctionnels sont bien le résultat d'un gain de fonction de la nouvelle queue C-terminale, dans le sens où la délétion de l'exon 9 n'apporte aucun effet fonctionnel^{93,233}. Ces données concordent avec les mutations retrouvées chez les patients, qui génèrent une séquence constante de 36 acides aminés au niveau terminal des protéines mutées, tandis que la protéine sauvage est normalement tronquée.

Toutefois, le pouvoir oncogénique de CALR^{mut} diffère de celui de JAK2^{V617F} dans la mesure où il atteint seulement les cellules exprimant MPL^{93,94,228,233}. En présence d'EPO-R ou d'autres récepteurs cytokiniques, les effets fonctionnels –la phosphorylation de STAT5 et la prolifération indépendante des cytokines- ne sont pas retrouvés. Seule une phosphorylation de STAT5 –sans indépendance cytokinique- est observée en présence de G-CSF-R et de CALR^{mut}^{93,233}. L'association préférentielle à MPL explique ainsi cet avantage prolifératif spécifique à la lignée mégacaryocytaire *in vitro* et *in vivo* et les pathologies associées aux mutants de CALR –TE et MFP- qui en résultent. L'étude par immunomarquage de l'expression de CALR sauvage et mutée avec des anticorps polyclonaux dans les cellules de moelle de patients atteints de NMP révèle une expression très forte des deux formes de CALR –sauvage et mutée- dans les mégacaryocytes, comparativement aux autres lignées myéloïdes²³⁴.

3.2.5 Modèles d'action des mutants CALR dans les NMP

3.2.5.1 Interaction persistante avec MPL

Si les mécanismes précis d'activation de la signalisation initiée par MPL en présence de CALR^{mut} restent à élucider, quelques pistes ont toutefois déjà été investiguées.

La première observation importante est l'interaction physique spécifique qu'il existe entre CALR^{mut} et MPL. En effet, seule CALR^{mut} interagit avec MPL^{93,94,228}, bien que sa spécificité d'interaction reste discutable : une interaction existerait aussi entre CALR^{mut} et l'EPO-R ou le G-CSF-R²²⁸, mais celle-ci n'est pas unanime⁹⁴. Néanmoins, l'interaction avec ce dernier est probable dans la mesure où la voie JAK2/STAT est activée en cas d'expression conjointe de CALR^{mut} et de G-CSF-R²³³. Seule la partie extracellulaire de MPL, et plus précisément ses résidus de glycosylation, est nécessaire à la liaison de CALR^{mut}, qui assure l'interaction au niveau des sites d'interaction avec les sites lectines du domaine N, notamment F106 et D135. Cette liaison se fait indépendamment du site de liaison de la TPO à MPL, et stabiliserait une conformation particulière du récepteur qui induirait l'activation d'une signalisation (**Figure 18**). De plus, cette liaison de CALR^{mut} à MPL engendrerait une altération du trafic de MPL vers la membrane. En effet, on retrouve une augmentation de la proportion de MPL aux motifs polysaccharidiques immatures et non édités dans le Golgi²³³. MPL est partiellement glycosylé et associé à CALR^{mut} à la surface cellulaire, suggérant une anomalie de maturation et éventuellement d'adressage à la surface. Les effets de l'expression de CALR^{mut} sur l'expression de MPL à la surface des cellules restent discutables^{228,229}. Cependant, on peut penser que le récepteur est moins présent à la surface cellulaire du fait d'une atténuation de la réponse à la TPO en présence de CALR^{mut}^{93,95,229}.

Dans un contexte sauvage, l'interaction entre le domaine N de la CALR et le récepteur MPL est inhibée par son domaine P. Néanmoins, cette inhibition est levée en présence de la nouvelle queue C-terminale générée par les mutations²²⁸. Toutefois, le remplacement au niveau du domaine C de tous les résidus non chargés en glycine ne modifie pas le pouvoir oncogénique de CALR^{mut}⁹⁴. Aussi, les mutations del52, ins5 et del61 murines induisent une activation de MPL humain, malgré une séquence différente de leurs homologues humains²²⁹. Ainsi, cette nouvelle caractéristique du domaine C muté n'est pas due à une séquence spécifique d'acides aminés, mais aux multiples charges positives engendrées.

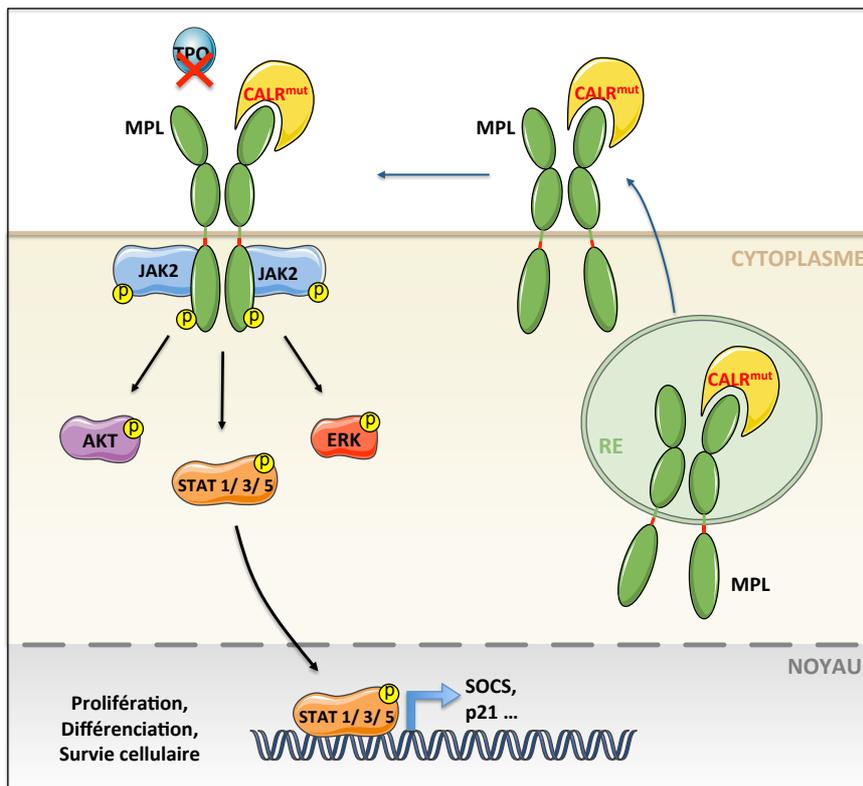


Figure 18. Hypothèse d'activation constitutive de la voie JAK/STAT par CALR^{mut}. L'interaction qui s'opère dans le RE entre CALR^{mut} et la future partie extracellulaire de MPL serait maintenue dans l'appareil de Golgi, du fait de la nouvelle queue C-terminale de CALR^{mut} qui empêche l'inhibition de cette interaction médiée par le domaine P de CALR. Le complexe MPL-CALR^{mut} est alors adressé de manière anormale à la membrane, et cette liaison, indépendamment du site de liaison de la TPO à MPL, stabiliserait une conformation particulière du récepteur qui induirait l'activation de protéines en aval telles que les STATs et des signaux de survie et prolifération cellulaire.

3.2.5.2 Perturbation de la signalisation calcique

La question de l'impact de CALR^{mut} sur la signalisation calcique est légitime, dans la mesure où la régulation calcique est l'une des deux grandes fonctions de la CALR et que ces mutations perturbent directement les résidus impliqués dans cette fonction.

Les mutations de type 1 –associées à la conservation d'un minimum de résidus chargés négativement- empêchent la fixation optimale du calcium, augmentent son amplitude de libération depuis le RE et son influx dans les cellules à partir du milieu extracellulaire. Les mutations de type 2, quant à elles, conservent plus de résidus chargés négativement et ne semblent pas perturber la signalisation calcique de manière significative²³⁵. Néanmoins, on a précédemment montré que l'intensité de signalisation en aval de MPL ne variait pas entre les mutations de type 1 et de type 2 *in vitro*. Les différences phénotypiques observées entre ces deux types de mutation, à la fois chez les patients et dans les modèles murins, peuvent donc provenir d'un différentiel de signalisation calcique.

3.2.5.3 Action sécrétrice de la protéine

Compte tenu de l'implication cruciale de CALR dans le bon repliement et dans le bon adressage des glycoprotéines vers les voies de sécrétion, mais aussi de l'impact des cytokines dans l'hématopoïèse, il est tout à fait probable qu'un effet paracrine de CALR^{mut} puisse lui conférer son pouvoir oncogénique, en étant elle-même sécrétée dans le but d'activer le récepteur MPL de manière constitutive, en activant des cellules de l'immunité ou d'autres cellules hématopoïétiques ou en induisant un adressage membranaire et une sécrétion altérés de glycoprotéines. A ce propos, une étude du profil sécrétoire des différentes mutations a été menée, et il a été observé que les mutations de type 1 favorisaient la sécrétion de multiples cytokines –GM-CSF, IL-10, IL-12, MIP-1 α , MIP-1 β - tandis que les mutations de type 2 ne stimulaient principalement que la sécrétion d'IL-7 et de MIG²³⁶. Toutefois, ce secrétome a été réalisé sur des monocytes purifiés provenant de patients CALR^{mut} ou conditionnés par le surnageant de cellules HeLa transfectées avec CALR, et aurait été plus informatif s'il avait été effectué sur des cellules aux caractéristiques mégacaryocytaires.

Pour autant, la co-culture de lignées UT-7 non transduites ou exprimant la mutation de type 2 ne favorise pas la croissance des premières en présence ou en absence de TPO exogène²²⁸ et l'ajout de concentrés de surnageant de cellules 32D exprimant la mutation de type 1 n'induit pas d'indépendance aux cytokines des cellules CALR sauvages²³⁷.

Bien qu'existant, le mode d'action paracrine de CALR ne semble donc pas influencer la pathophysiologie des NMP mutés CALR.

3.2.5.4 Un marqueur clé de la phagocytose

L'expression de CALR à la surface cellulaire joue un rôle crucial dans la phagocytose. En effet, elle serait un marqueur cellulaire membranaire indispensable pour la phagocytose, transloquée à la surface des cellules apoptotiques et reconnue par les macrophages et les cellules dendritiques, aussi bien dans un contexte physiologique que dans le cadre de cancers. Etant donné que l'absence du motif KDEL -motif de rétention dans le RE- dans la queue C-terminale du mutant CALR affecte sa localisation, il est probable qu'il y ait une sensibilité différente des cellules CALR^{mut} à la phagocytose. Bien que l'expression de CALR^{mut} semble augmentée à la surface des cellules²²⁸, elle ne change pas au cours de la différenciation

hématopoïétique et les cellules ne semblent pas plus sujettes à la phagocytose, du moins en terme de phagocytose liée aux macrophages²³⁸.

Au final, l'activation des voies de signalisation JAK/STAT, mais aussi MAPK et PI3K/AKT responsable des phénotypes myéloprolifératifs observés s'explique plus probablement par l'interaction possible entre une région particulière de MPL et les charges positives de la queue C-terminale nouvellement formée de CALR^{mut}.

Chapitre 4. Les traitements dans les NMP classiques

Depuis les premières spéculations de Dameshek, de nombreuses zones d'ombre ont été éclaircies concernant la complexité moléculaire des NMP classiques, notamment l'implication de la signalisation constitutive de JAK2 et par conséquent des voies STAT, PI3K et MAPK. Il est à présent crucial de trouver des moyens thérapeutiques efficaces dans le but de conduire à une rémission complète de ces maladies. La découverte de JAK2^{V617F} a permis l'investigation rapide des inhibiteurs de JAK2, les thérapies conventionnelles ne montrant pas de réel impact curatif sur la TE, la PV et la MFP mais dont les buts premiers sont d'empêcher les événements thrombo-hémorragiques des TE/PV et de soulager l'anémie, la splénomégalie et les symptômes fréquents des MFP. Bien que le traitement à l'interféron alpha (IFN α) a montré un certain taux de rémission complète dans les PV, la seule approche vraiment curative dans les MFP reste la transplantation allogénique de CSH.

4.1 Les approches thérapeutiques conventionnelles

4.1.1 La Thrombocytémie Essentielle (TE)

Les traitements traditionnels ont pour but de normaliser le nombre de plaquettes et de faire disparaître les symptômes en lien avec la thrombocytose. L'aspirine, ou acide acétylsalicylique (AAS), inhibe le thromboxane qui favorise l'agrégation plaquettaire en contexte physiologique. Chez les patients TE JAK2^{V617F} ou ceux qui ont des facteurs de risque cardiovasculaires, l'aspirine est recommandée à faible dose (40-100 mg/jour) comme thérapie antiplaquettaire étant donné les effets bénéfiques sur la thrombose et les troubles micro-vasculaires^{239,240,241}. Cependant,

dans les TE à faible risque, une stratégie attentiste est préférable en première prophylaxie de la thrombose. Chez les patients à haut risque –dont l'âge dépasse 60 ans, dont le compte plaquettaire dépasse $600 \cdot 10^9/L$ et qui possèdent des facteurs de risque cardiovasculaires-, il est plutôt recommandé de suivre en première intention une thérapie cytoréductrice, telle que l'hydroxyurée (HU) ou l'hydroxycarbamide, un agent anti-néoplasique qui est un anti-métabolite inhibant la synthèse d'ADN par inhibition de la ribonucléotide réductase et qui prévient la thrombose²⁴². Le but de ce traitement est de réduire le nombre de plaquettes sous le seuil de $400 \cdot 10^9/L$.

Les patients intolérants ou résistants à l'HU peuvent alors être traités en seconde intention à l'anagrélide (Xagrid®) en France, un médicament ciblant l'AMP cyclique phosphodiesterase III et qui réduit le nombre de plaquettes en altérant la maturation des mégacaryocytes²⁴³. Néanmoins, les TE JAK2^{V617F} semblent plus sensibles à l'HU qu'à l'anagrélide¹⁰¹ et globalement, les patients TE traités à l'anagrélide présentent une diminution du niveau d'hémoglobine et une augmentation de la fibrose dans la moelle²⁴⁴. Dans les TE de haut risque, la combinaison anagrélide et aspirine est plus fortement corrélée au développement de la thrombose artérielle, d'hémorragie et à la transformation vers la MF que la combinaison HU et aspirine²⁴⁵. Ainsi, des précautions particulières sont nécessaires quant à l'administration de ce traitement, d'autant plus que beaucoup renoncent au traitement du fait de nombreux effets secondaires indésirables. Les TE qui ne répondent ni à l'HU ni à l'anagrélide peuvent alors être traitées en sous-cutané par l'IFN α recombinant (90 μg /semaine), qui permet une diminution du compte plaquettaire ainsi que dans de nombreux cas de la charge allélique de JAK2^{V617F} (voir ci-après la sous-partie destinée à l'IFN α). Ce traitement est recommandé aux patients plutôt jeunes (<65 ans), contrairement au busulfan, un agent alkylant, administré aux patients âgés dans le but d'obtenir une réponse hématologique avec une normalisation du compte plaquettaire (< $400 \cdot 10^9/L$)²³⁹, mais qui est mutagène. Dans une étude de 36 TE, tous répondent au busulfan et observent une disparition des symptômes liés à la thrombocytose²⁴⁶.

D'autres agents cytoréducteurs, notamment le radiophosphore (p^{32}) et le pipobroman –un autre agent alkylant-, sont efficaces pour diminuer le nombre de plaquettes, mais sont associés à une transformation myélofibrotique et leucémique et ne sont recommandés que pour les patients âgés de haut-risque (>75 ans)²⁴³.

4.1.2 La Polyglobulie de Vaquez (PV)

Les principaux enjeux des traitements contre la PV sont de maintenir un hématicrite correct et de réduire le risque de morbidité. La saignée est la première mesure réalisée chez les patients PV dans le but de maintenir ou de réduire l'hématocrite sous le seuil de 45%^{247,248}. En effet, les patients dont l'hématocrite est inférieur à 45% observent un taux de décès dû à des problèmes cardiovasculaires ainsi qu'un taux de thrombose significativement plus faibles que ceux dont l'hématocrite se situe entre 45% et 50%²⁴⁹. Néanmoins, ce traitement non-invasif n'empêche pas l'hyperprolifération du compartiment myéloïde. L'aspirine est recommandée chez les PV pour prévenir les complications thrombotiques²⁵⁰.

Les PV de haut risque peuvent aussi démarrer une thérapie cytoréductrice telle que l'HU dans le but de maintenir les plaquettes sous le seuil de $400.10^9/L$ et les leucocytes, au dessus de $2.10^9/L$ ²³⁹. Les patients intolérants ou résistants peuvent alors se tourner vers l'IFN α (voir ci-après la sous-partie destinée à l'IFN α). De plus, depuis quelques années, le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/2, est également utilisé dans les PV intolérantes ou résistantes à l'HU et joue sur les paramètres hématologiques (plaquettes, hématicrite), la taille de la rate -si palpable- et surtout les symptômes comme le prurit, les sueurs nocturnes et les douleurs osseuses²⁵¹.

Le busulfan, le phosphore radioactif P³² et le pipobroman sont aussi des traitements envisageables pour les patients âgés de plus de 65 ans. Le busulfan induit une rémission et une survie globalement plus longues que P³² dans les PV²⁵². Dans une étude comparative, le pipobroman est associé à une incidence plus forte de transformation en LAM/SMD tandis que l'HU est associée à une transformation myélofibrotique²⁵³.

4.1.3 La Myélofibrose Primaire (MFP)

Pour l'heure, aucun traitement curatif pharmacologique n'existe. La seule thérapie curative reste l'allogreffe de CSH, mais, du fait d'un fort risque de morbidité et de mortalité, n'est réservée qu'aux patients de haut risque²⁵⁴.

Une stratégie plutôt attentiste est conseillée dans le cas des MFP asymptomatiques, les indications cliniques d'un traitement étant l'anémie ou la splénomégalie.

L'anémie peut être traitée avec des androgènes, la prednisone, le danazol, la thalidomide ou lénalidomide ainsi que des drogues stimulant l'érythropoïèse. La prednisone, le danazol et les androgènes connaissent une réponse de 30 à 40%²⁵⁵

tandis que la thalidomide, une drogue immuno-modulatrice et anti-angiogénique, est efficace chez 20% des patients. Le prednisone, en combinaison avec la thalidomide à faible dose, permet de réduire les effets néfastes de ce dernier²⁵⁶ et connaît une réponse de 19 à 30% en combinaison avec le lénalidomide, un dérivé de la thalidomide, bien que la myélosuppression soit un gros facteur limitant²³⁹. Le lénalidomide seul permet une diminution de la charge allélique de JAK2^{V617F} chez quelques patients et est particulièrement efficace chez les patients del(5q13)^{257,258}. L'EPO n'est pas recommandée pour traiter l'anémie du fait de ses effets aggravants sur la splénomégalie et de son inefficacité sur les patients transfusés²³⁹.

L'HU est la thérapie cytoréductrice la plus commune pour traiter la splénomégalie puisqu'elle permet, chez 40% des patients, une réduction significative du volume splénique²⁵⁹. En cas de non-réponse ou de contre-indications –hypertension portale ou fusions de sang rapide-, il est recommandé d'effectuer une splénectomie. Toutefois, 50% des patients souffrent de complications post-splénectomiques : saignements, thrombocytose, hépatomégalie, thrombose et augmentation de blastes circulants²³⁹. La radiothérapie est aussi une solution pour traiter l'érythroïèse extra-médullaire mais les rémissions sont bien souvent transitoires²⁶⁰.

Malgré les effets bénéfiques des thérapies conventionnelles, la guérison demeure difficile du fait de leur non-spécificité, de leurs effets secondaires et de leur faible taux de réponse. De multiples stratégies thérapeutiques –les inhibiteurs de JAK2, des histones désacétylases ou le pomalidomide- ont alors été envisagées, et certaines ont pu franchir la barrière des essais cliniques.

4.2 Les principaux inhibiteurs de JAKs

Les inhibiteurs de JAKs sont classés selon leur mécanisme d'action et selon la région ciblée de la kinase. Les inhibiteurs de type I, qui englobent tous les inhibiteurs en phase clinique détaillés ci-après, ciblent le site de fixation à l'ATP du domaine tyrosine kinase des JAKs dans leur conformation active. Beaucoup d'inhibiteurs ciblent JAK1 ainsi que JAK2 et éventuellement TYK2 (ruxolitinib, momelotinib), ou pan-JAK (gandotinib) ou encore JAK2 et FLT3 (pacritinib, fedratinib, NS-018). La fixation de ces inhibiteurs à des JAK actives représente la grande limitation de ces inhibiteurs de type 1. En effet, ils bloquent l'action catalytique des kinases tout en augmentant le nombre de molécules de JAK inactives mais phosphorylées sur le

résidu Y1007 dans la boucle d'activation. Par la suite ces JAK phosphorylées peuvent créer des hétérodimères avec d'autres JAK (JAK1 et TYK2) et restimuler la signalisation STAT²⁶¹. Ainsi, la résistance à l'inhibition de JAK2 ne serait pas liée aux mutations comme c'est le cas pour d'autres inhibiteurs de kinases, mais à une réactivation de la voie ou à une autre adaptation fonctionnelle²⁶².

Les inhibiteurs de type II se fixent dans la poche de fixation de l'ATP du domaine kinase en conformation inactive, contrairement aux inhibiteurs de type I, et le F de la poche DFG est en conformation « out ». Cette inhibition est plus efficace et n'est pas inversée en cas de détachement de la drogue²⁶³. Ainsi, NVP-BBT594 et NVP-CHZ868, deux inhibiteurs de type II, ont été développés. NVP-CHZ868 a montré son efficacité dans des modèles précliniques²⁶⁴. Toutefois, induisant une profonde cytopénie, ces deux inhibiteurs limitent leur future utilisation dans les PV/TE.

4.2.1 Le ruxolitinib ou JAKAVI (INCB018424)

Le ruxolitinib a été développé par Incyte puis par Novartis. Il inhibe JAK2 mais aussi JAK1 et JAK3 et permet l'inhibition de la signalisation anormale JAK2/STAT. En effet, de faibles concentrations de cet inhibiteur inhibent la prolifération cellulaire en inhibant les phosphorylations de STAT5 et ERK dans les lignées humaines JAK2^{V617F} mais pas dans les lignées BCR-ABL, et induisent l'apoptose²⁶⁵.

Il est aussi efficace *ex vivo* sur l'expansion de progéniteurs érythroïdes provenant de cellules primaires mutées JAK2. De plus, dans des modèles *in vivo* murins *Jak2*^{V617F}, il a un impact rapide sur les paramètres sanguins, améliore la splénomégalie et réduit les cytokines proinflammatoires anormalement sécrétées sans affecter la charge allélique de JAK2 muté²⁶⁶.

Le ruxolitinib est le premier inhibiteur de JAK1/2²⁶⁷ qui a été approuvé par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) et par l'agence européenne du médicament (EMA) dans le traitement des MF à moyen et haut risque depuis 2011 ainsi que dans les PV intolérantes ou résistantes à l'HU.

Dans les essais cliniques COMFORT-I et -II (Controlled Myelofibrosis Study with Oral JAK Inhibitor Treatment), il soulage les symptômes globaux des MF en réduisant les cytokines proinflammatoires et la splénomégalie dans plus de 40% des patients, indépendamment de la présence de JAK2^{V617F}²⁶⁸. Bien qu'il comporte des effets secondaires -thrombocytopénie et anémie- et que la réduction de la fibrose médullaire soit modeste²⁶⁹, le ruxolitinib permettrait une amélioration du taux de

survie des MFP²⁷⁰ qui est corrélée à la taille de la rate²⁷¹ mais ces données sont controversées.

Dans un contexte de PV ou de TE, il permet d'atténuer la splénomégalie et les symptômes globaux tels que l'érythrocytose mais est moins efficace sur la thrombocytose²³⁹. Toutefois, il est clairement possible que son effet positif sur la survie provienne seulement de ses effets anti-inflammatoires²⁷² (**Tableau 4**).

4.2.2 Le fedratinib (SAR302503 ou TG101348)

Cet inhibiteur montre qu'une diminution de la phosphorylation de STAT5 corrèle à une diminution de la formation de colonies endogènes, de l'hématocrite, de l'hyperleucocytose, de la splénomégalie et un blocage complet de la fibrose et de l'ostéosclérose. De plus, il semble agir aussi sur la charge allélique des progéniteurs JAK2^{V617F} dans plusieurs modèles rétroviraux ou KI JAK2^{V617F} ^{273,274}.

Il s'agit d'un des rares inhibiteurs de JAK2/FLT3 testé en essai clinique de phase III chez les MF, dont 39% des patients répondent concernant la splénomégalie et plus de 50% concernant les symptômes globaux de la maladie. Ce traitement permet aussi une correction de la leucocytose et de la thrombocytose chez plus de 70% des patients. De plus, chez 45% des patients –notamment ceux à forte charge allélique JAK2^{V617F}-, le fedratinib permet une diminution significative et durable de plus de 50% de la charge allélique²⁷⁵, bien qu'il soit sans effet ou avec l'effet inverse chez quelques patients.

L'étude JAKARTA a montré une réduction de la fibrose, mais quelques rares patients ont développé l'encéphalopathie de Wernicke ce qui a conduit à l'arrêt des essais cliniques^{276,277,278}. Suite à des incertitudes, la FDA a ré-autorisé les essais courant 2017, planifiés pour 2018 (**Tableau 4**).

4.2.3 Le momelotinib (CYT387 ou GS0387)

Le CYT387 normalise le nombre de leucocytes, l'hématocrite, la taille de la rate, restaure les niveaux physiologiques des cytokines inflammatoires et réduit la charge allélique de JAK2^{V617F} dans un modèle murin²⁷⁹.

En phase I/II chez les MF, CYT387 –un inhibiteur de JAK1/2- a montré une réponse de plus de 45% sur l'anémie, la splénomégalie et les symptômes globaux des MFP à moyen et haut risque. Les patients qui ne répondaient ni au ruxolitinib, ni au pomalidomide, ni au SAR302503, ont tendance à répondre au CYT387. De plus,

environ 58% des patients transfusés développent une indépendance à la transfusion du fait d'une amélioration majeure de l'anémie²⁸⁰. En effet, cet inhibiteur touche également ALK-2 (activin receptor-like kinase-2) qui induit une diminution de production de l'hepcidine. Ainsi, le momelotinib semblait être une bonne alternative au ruxolitinib pour les patients anémiques. Cependant, durant la phase III (SIMPLIFY-I et –II), les résultats n'ont pas montré d'avantage majeur du momelotinib sur le ruxolitinib²⁸¹ et son développement a été arrêté (**Tableau 4**).

4.2.4 Le gandotinib (LY2784544)

Cet inhibiteur a été découvert grâce à un criblage utilisant des cellules Ba/F3 JAK2^{V617F} montrant un effet sélectif sur JAK2. De plus, Dans un modèle de souris immunodéficient injecté avec des cellules Ba/F3-JAK2^{V617F}-GFP, cet inhibiteur diminue la charge allélique de JAK2^{V617F} et inhibe la phosphorylation de STAT5 dans les cellules tumorales Ba/F3-JAK2^{V617F}. Enfin, cet inhibiteur semble plus spécifique de JAK2^{V617F} que de JAK2^{WT}²⁸². Dans un essai clinique de phase I sur les PV et MFP, le LY2784544 réduit la taille de la rate²⁸³ (**Tableau 4**).

4.2.5 Le pacritinib (SB1518)

Il s'agit d'un inhibiteur de JAK2/FLT3 dont les résultats ont été prometteurs en phase I et II d'essai clinique, avec peu d'effets immunosuppresseurs²⁸⁴ et sans développement de thrombocytopénie. Les études de phase III (PERSIST-I et –II) ont été arrêtées en 2016 du fait de problèmes cardiaques et d'hémorragies chez les patients traités avant d'être reprises par CTI BioPharma en 2017 (**Tableau 4**).

4.2.6 Le BMS-911543

BMS-911543 présente une très bonne sélectivité à JAK2, comparée à JAK1, JAK3 et TYK2 comme le fedratinib. Il a une forte activité antiproliférative dans les lignées Ba/F3-JAK2^{V617F} et SET2, en agissant notamment sur la phosphorylation de STAT5, et induit aussi la normalisation de pSTAT5 de façon dose-réponse dans un modèle murin²⁸⁵. Il a montré des résultats encourageants sur des modèles précliniques, notamment dans la réduction du nombre de réticulocytes et de plaquettes et des essais cliniques de phase I et II dans le traitement des MF ont été réalisés²⁸⁶. Par la suite, son développement a été abandonné (**Tableau 4**).

Au total, ces inhibiteurs de JAK ne semblent ni sélectifs de JAK2 ni spécifiques de JAK2^{V617F} mais agissent sur les paramètres sanguins et les symptômes. Il en est de même pour d'autres inhibiteurs des JAKs tels que le lestaurtinib (CEP-701), NS018 et XL019^{268,287}. L'utilisation de certains de ces inhibiteurs semble favoriser l'apparition de nouvelles mutations génétiques, ce qui invite à envisager l'étude de combinaisons de traitements ou d'approches alternatives²⁸⁸.

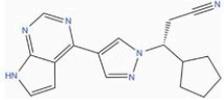
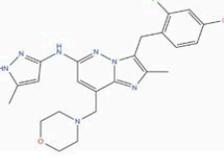
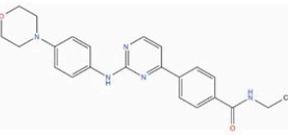
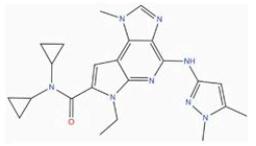
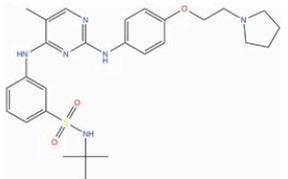
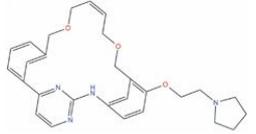
Inhibitor	Other names	Company	Compound Structure	Scaffolds	Type	Disease	JAK2 IC50 (nM) ^a	Other Targets	Status	Side effects
INCB018424	Ruxolitinib Jakavi	Incyte/Novartis		Pyrrolo-pyrimidine	Type-I	MF, PV	2.8	JAK1	FDA approved MF (2011) PV (2015)	Thrombocytopenia, Anemia, Neutropenia, Myelo-suppression
LY2784544	Gandotinib	Eli Lilly		Substituted imidazo-pyridazine	Type-I	ET, PV, MF Solid tumor	3	JAK1, JAK3	Phase I/II, ongoing Preclinic	Renal impairment, tumor lysis syndrome, gastrointestinal toxicity, anemia
CYT387	Momelotinib GS-0387	Cytosia, acquired Gilead		Amino-pyrimidine	Type-I	PMF, post PV MF, post ET MF	11	JAK1, TYK2 TBK1/IKK-ε, ALK-2	Phase III, ongoing	Withdrawal symptoms, neurological side effects (peripheral neuropathy)
BMS-911543		Bristol Myers Squibb		Imidazo-pyrrolo-pyridine	Type-I	MF	1	JAK1 JAK3 TYK2	Phase I/II, completed	Leukopenia, thrombocytopenia, neutropenia
TG101348	Fedratinib SAR302503	TargeGene Sanofi Aventis		Amino-pyrimidine (thiamine analog)	Type-I	MF	3	FLT3 RET	Phase III, development terminated in, Nov 2013	Wernicke's encephalopathy (due to resemblance of fedratinib with thiamine, VitB1, whose absorption was reduced by hTHTR2)
SB1518	Pacritinib	S*Bio, CTI biopharma		Macrocyclic pyrimidine-based	Type-I	MPN, AML, MDS	23	FLT3, IRAK1	Phase III, development terminated in Feb 2016	Intra-cerebral hemorrhage, cardiac failure and arrest, gastrointestinal toxicity

Tableau 4. Vue d'ensemble des principaux inhibiteurs de JAK2.

Pour revue: Leroy, E *et al.* Leukemia, 2017.

4.3 Les inhibiteurs d'HDAC

Les inhibiteurs des histones désacétylases (HDAC) sont aussi des traitements envisageables dans le cadre des NMP. Le givinostat a été montré comme inhibant la prolifération des cellules JAK2^{V617F} et la formation des colonies érythroïdes, en inhibant STAT5 et ERK. Il a aussi été montré qu'il dérégule les facteurs de transcription hématopoïétiques NFE2 et C-MYB de façon JAK2 indépendante²⁸⁹.

Lors d'un essai clinique ouvert, le givinostat -inhibiteur d'HDAC oral- induit une réduction de la taille de la rate et du prurit dans un sous-groupe de patients, alors sans saignées dans les PV. Une légère diminution de la charge allélique de JAK2^{V617F} est aussi observée dans les TE/PV mais pas dans les MF²⁹⁰.

Il a été suggéré que les inhibiteurs d'HDAC étaient capables de désactiver les protéines chaperonnes de JAK2 comme HSP90 et n'agiraient donc pas directement sur l'épigénétique mais sur la stabilisation de JAK2²⁹¹.

4.4 Les inhibiteurs des HSP

Différentes HSP ont été trouvées surexprimées dans les NMP comme HSP90, 70 et 27. HSP90 et HSP70 sont des protéines chaperonnes dépendantes de l'ATP qui se fixent et stabilisent les protéines, plus particulièrement la protéine JAK2^{V617F} pour HSP90. HSP27, quant à elle, est indépendante de l'ATP.

Le PU-H71 -puissant inhibiteur d'HSP90- se lie à JAK2 et le dégrade dans les cellules mutées, ce qui altère la voie JAK/STAT. Chez la souris, ce traitement permet une normalisation de la numération sanguine périphérique, de la splénomégalie ainsi qu'une réduction de la charge allélique de JAK2^{V617F}²⁹². En effet, en dégradant JAK2, ces inhibiteurs bloquent les voies JAK2/STAT5, MAPK et PI3K/AKT dans les cellules JAK2^{V617F} résistantes aux inhibiteurs de JAK2. Ainsi, HSP90 est une cible thérapeutique majeure des NMP résistants aux inhibiteurs de JAK2²⁸⁸.

ADD70, un inhibiteur de HSP70, permet de séquestrer dans le cytosol cette même chaperonne et de sensibiliser les cellules cancéreuses à la mort induite par les chimiothérapies²⁹³. OGX-427, quant à lui, est un oligonucléotide synthétique qui inhibe efficacement l'expression d'HSP27 dans les MF et réduit l'expansion mégacaryocytaire, la splénomégalie et la fibrose²⁹⁴.

Une approche thérapeutique efficace consiste en un traitement qui cible les cellules mutées ou une voie de signalisation spécifique de son effet dans le but de guérir la maladie. Bien que tous les effecteurs moléculaires des NMP ne soient encore connus, la voie JAK/STAT demeure de loin la cible principale. En effet, la plupart des patients présentent des mutations activatrices de cette voie : JAK2, MPL, CALR. Pour l'heure, la majorité des traitements développés dans les NMP agissent sur les paramètres sanguins et les symptômes mais quasiment aucun ne permet de guérir la maladie à long terme, hormis la transplantation allogénique dans les MFP. Il reste

donc une place considérable à l'amélioration de la thérapie et l'IFN α , qui est capable d'induire des guérisons dans certains cas, fait partie des traitements prometteurs. La compréhension de son mécanisme d'action, pour l'heure peu investiguée dans les NMP, permettrait d'améliorer le traitement et d'augmenter les guérisons.

4.5 L'interféron

Les interférons (IFN) sont des cytokines largement exprimées qui constituent la première ligne de défense contre les infections virales, que ce soit des virus à ADN ou à ARN mono ou bicaténaires, mais aussi contre les infections bactériennes et parasitaires, et jouent un rôle important dans l'immunité adaptative ainsi que dans la surveillance des cellules malignes. La famille des IFN est composée de trois classes : les IFNs de type I, de type II et de type III. Ces 3 types d'IFN induisent différentes signalisations qui varient en fonction des profils d'expression des ISG (IFN-stimulated genes), des cinétiques, des activités antivirales et antiprolifératives, et du potentiel immunomodulateur.

4.5.1 Découverte de l'IFN de type I

Dans les années 1950, il était largement établi que, sous certaines conditions, les cellules infectées par un virus étaient résistantes à l'infection d'un second virus, suggérant une certaine interférence inter-virale. En effet, le virus *influenza* inactivé pouvait interférer avec la réplication du virus vivant, mais l'agent responsable de cette interférence était encore inconnu. En 1957, Isaacs et Lindenmann nomment alors cette substance produite par les cellules et interférant avec les virus : l'« interféron ».

Ainsi, les protéines extraites du milieu où les leucocytes sont stimulés ont longtemps servi de source d'IFN, bien avant que les méthodes développées soient suffisantes pour mieux purifier et caractériser ses propriétés. A présent, cette substance est décrite comme une petite protéine, produite et sécrétée par les cellules, et qui détecte les PAMPs (Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes) grâce à leur PRR (Récepteur de Reconnaissance de Motifs Moléculaires). Les chercheurs ont ensuite montré l'existence –non pas d'un seul IFN- mais d'une famille de protéines distinctes qui se différencient par les récepteurs sur lesquels elles se fixent.

4.5.2 Généralités et voies de signalisation des IFNs

Chez l'Homme, les IFNs de type I possèdent 5 homologues structuraux : l'IFN- α (subdivisé en 13 sous-types : IFN α 1, α 2, α 4, α 5, α 6, α 7, α 8, α 10, α 13, α 14, α 16, α 17 et α 21), l'IFN β , l'IFN ϵ , l'IFN κ , et l'IFN ω qui sont sécrétés par presque tous les types cellulaires (notamment l'IFN α et β), mais principalement par les cellules dendritiques au cours de l'infection virale (notamment l'IFN α).

L'IFN α se fixe à son récepteur de type I d'intérêt -IFNAR- qui comprend aussi deux chaînes : IFNAR1 et IFNAR2. IFNAR2 possède 3 isoformes : IFNAR2-a, -b et -c. IFNAR2-a est impliqué dans la signalisation et IFNAR2-b est l'isoforme courte et dominante négative. Dans la plupart des cas, le récepteur IFNAR se compose d'IFNAR1 et d'IFNAR2-c –l'isoforme longue transmembranaire- et se fixe à TYK2 et JAK1, respectivement. La liaison de l'IFN α à son récepteur induit sa dimérisation et sa phosphorylation par les JAKs préalablement phosphorylées qui permettent alors l'homo ou l'hétérodimérisation des STATs. Par la suite, l'hétérodimère STAT1-STAT2 se fixe à IRF9 (IFN Regulatory Factor 9) pour former le complexe ISGF3 (IFN Stimulated Gene Factor 3) qui va alors être transloqué dans le noyau et se fixer aux régions promotrices des éléments de réponse ISRE (IFN Stimulated Response Element) induisant ainsi la transcription des ISGs.

L'IFN γ est le seul IFN de type II et est exclusivement sécrété par les cellules immunitaires. Toutefois, la plupart des types cellulaires sont capable d'y répondre, ses récepteurs étant largement ubiquitaires. L'IFN γ est un homodimère et se fixe à son récepteur composé de deux sous-unités : IFNGR1 et IFNGR2, associés à JAK1 et JAK2, respectivement. La dimérisation du récepteur induit la transphosphorylation de JAK1 et JAK2 en aval, et la phosphorylation du récepteur entraîne ensuite le recrutement et la phosphorylation de STAT1, sous forme d'homodimère appelé GAF (IFN γ Activation Factor). La translocation de GAF dans le noyau et sa fixation aux promoteurs des éléments de réponse GAS (Gamma-activated Sequence) conduisent alors à l'expression de gènes cibles (ISGs). (**Figure 19**). Enfin, l'IFN λ –IFN λ 1, λ 2, λ 3 et plus récemment λ 4- forme une nouvelle classe d'IFN (de type III) et partage les mêmes activités virales que le type I, bien que structurellement différent. En effet, on retrouve des caractéristiques en commun avec la famille de l'IL-10 puisqu'ils utilisent la même sous-unité de récepteurs (IL-10R2), l'autre sous-unité (IFNLR1) leur étant spécifique et étant seulement exprimée dans les cellules épithéliales. Ils empruntent

la même voie que les IFN de type I -phosphorylation de JAK1 et TYK2 et hétérodimérisation de STAT1 et 2- et induisent l'expression d'ISGs communes (**Figure 19**).

La diversité de signalisation des IFNs est acquise en partie grâce à un différentiel de résidus phosphorylés au niveau des différentes chaînes de récepteurs permettant le recrutement des STAT1, 2 et 5 et la formation de différents dimères de STATs mais aussi par d'autres molécules de signalisation en aval tels que les voies MAPK et PI3K.

Parmi tous ces IFNs, l'IFN α et β sont approuvés dans le traitement de plusieurs maladies telles que les infections virales chroniques (hépatite B et C), la sclérose multiple et les mélanomes du fait de ses propriétés anti-virales et anti-prolifératives. Seul l'IFN α 2 a montré une utilité thérapeutique dans les hémopathies myéloïdes malignes telles que la LMC ou les NMP.

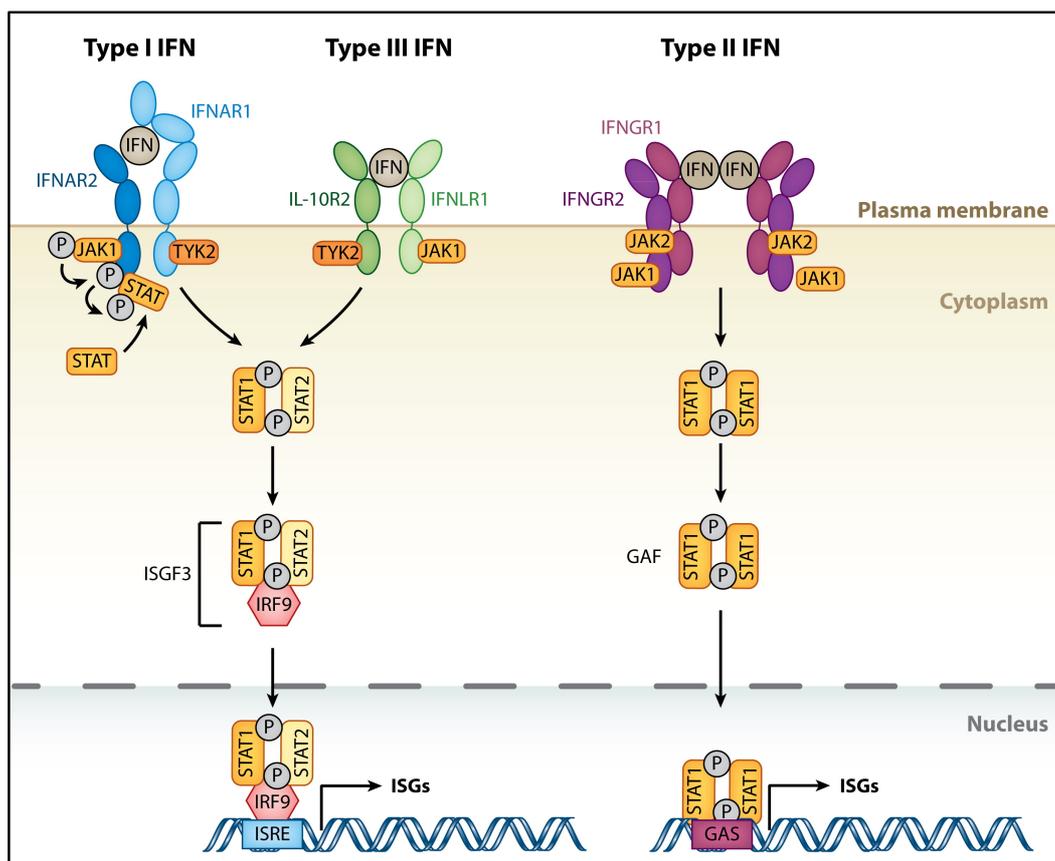


Figure 19. La signalisation de l'IFN. En se fixant aux récepteurs IFNAR1/2 ou IL-10R2/IFNLR1, les IFNs de type I et III déclenchent les phosphorylations de JAK1 et TYK2, ce qui induit la phosphorylation de leurs récepteurs puis de STAT1 et 2. Leur association, sous forme d'hétérodimères, permet le recrutement d'IRF9 et forme ISGF3. En se fixant aux récepteurs IFNGR1/2, les dimères d'IFN de type II entraînent la phosphorylation de JAK1 et JAK2, la transphosphorylation des récepteurs puis la phosphorylation de STAT1. Les homodimères de STAT1 phosphorylés forment l'IFN- γ activation factor (GAF). ISGF3 et GAF se transloquent tous deux au noyau pour induire l'expression de gènes antiviraux régulée respectivement par les IFN-stimulated response elements (ISRE) ou les gamma-activated sequence (GAS). Pour revue: Schneider, W *et al.* Annu. Rev. Immunol. 2014.

4.5.3 Les ISGs, des médiateurs phares de l'IFN de type I

De nombreux ISGs contrôlent l'infection virale, bactérienne ou parasitaire en ciblant directement les voies et les fonctions requises pendant le cycle de vie du pathogène. Certains ISGs induisent l'expression de chimiokines et de leurs récepteurs augmentant la communication intercellulaire et codent pour des protéines pro-apoptotiques menant à la mort cellulaire, d'autres -les régulateurs négatifs de la voie de l'IFN α - facilitent le retour à une homéostasie cellulaire.

4.5.3.1 Sensibilisation à l'IFN de type I

Au sein des PRRs, les ALRs (AIM2-like receptors) tels que IFI16 ainsi que la GMP-AMP cyclique synthase sont spécialisés dans la reconnaissance de l'ADN étranger²⁹⁸ tandis que les RLRs (RIG-I-like receptors), tout comme l'OAS (2'-5'-oligoadenylate synthétase) et la PKR (protéine kinase R) détectent l'ARN viral simple ou double brin²⁹⁹. Ainsi, l'OAS détecte l'ARN étranger et produit l'acide adénylique 2'-5' qui active la RnaseL (Rnase latente), dont les produits de dégradation obtenus stimulent les RLRs. Enfin, les TLRs (Toll-like receptors) sont des protéines transmembranaires capables de détecter les glycoprotéines virales et les PAMPs bactériens. Les signaux induits par tous ces récepteurs activent des facteurs de transcription par le biais de STING (Stimulator of IFN genes) et de MAVS (Mitochondrial Antiviral-Signaling Protein) aux niveaux des interactions membranaires entre le RE et les mitochondries³⁰⁰. L'activation de STING/MAVS induit la phosphorylation des IRF3 et 7 ou la phosphorylation et la dégradation par ubiquitination de κ B. Les dimères d'IRF3/7 ou NF- κ B sont alors transloqués au noyau, où ils se fixent à des régions promotrices spécifiques, ce qui va déclencher l'activation transcriptionnelle de l'IFN de type I et de quelques ISGs, incluant les IRFs, les PRRs ainsi que des effecteurs antiviraux comme la vipérine. Après induction, ces ISGs renforcent la signalisation de l'IFN de type I et permettent de préparer les cellules à une détection renforcée des pathogènes.

L'IFN de type I active par la suite la voie JAK/STAT et de nombreux ISGs -effecteurs antiviraux, régulateurs positifs et négatifs de la voie de l'IFN- dont IRF1, qui est aussi le seul ISG à se transloquer directement dans le noyau pour induire l'expression rapide de certains ISGs, indépendamment de la voie JAK/STAT ou de modifications post-traductionnelles additionnelles³⁰¹.

La plupart des ISGs sont présentes à faible niveau avant stimulation dans le but de minimiser le risque d'une signalisation aberrante qui pourrait entraîner l'inflammation, tout en permettant la détection des pathogènes et le déclenchement des processus de l'immunité innée. Parmi les ISGs antivirales, certaines inhibent l'entrée cellulaire du virus, comme Mx1 et 2 (Myxovirus résistance) ou les protéines IFITM (IFN-inducible transmembrane), d'autres inhibent la traduction virale et sont impliquées dans la dégradation de l'ARN viral telles que les IFIT (IFN-induced proteins with tetratricopeptide repeats). TRIM22 (Tripartite motif protein 22) inhibe la transcription, la réplication et le trafic des protéines virales à la membrane plasmique et ISG15 inhibe la traduction, la réplication et l'égression virale.

4.5.3.2 Désensibilisation à l'IFN de type I

La réponse à l'IFN est fermement contrôlée. En effet, après exposition, les cellules entrent rapidement dans un état de désensibilisation qui peut durer plusieurs jours³⁰² et qui leur permet d'amorcer un retour à l'état basal, sans signalisation induite par l'IFN de type I. Une altération de la production ou de la signalisation de cet IFN peut entraîner des maladies auto-immunes, ce qui témoigne de l'importance de réguler négativement cette réponse. Cette désensibilisation est permise par plusieurs mécanismes, intrinsèques ou médiés par les ISGs.

L'endocytose et le recyclage des récepteurs à l'IFN de type I représentent le mécanisme immédiat de désensibilisation à l'IFN par le biais de phosphatases (PTP) et d'inhibiteurs de STAT (PIAS) qui réduisent le niveau de la signalisation JAK-STAT au sein de la cellule (**Figure 20**). Les PIAS induisent alors la SUMOylation des STATs par un processus similaire à l'ubiquitination. Un deuxième mécanisme précoce requiert la synthèse *de novo* d'inhibiteurs protéiques. Ainsi, les SOCS agissent comme des inhibiteurs de kinase aux niveaux des résidus tyrosines phosphorylés et au sein de la cascade de phosphorylation JAK/STAT, notamment SOCS1 et 3 qui sont des pseudo-substrats des JAKs. Les PIAS, indépendamment de la SUMOylation, peuvent aussi se lier aux STATs phosphorylés, les inhiber et induire l'interruption de la cascade de signalisation, en empêchant notamment la fixation des facteurs de transcription à l'ADN (**Figure 20**).

Enfin, USP18 (Ubiquitin-specific peptidase 18) est l'ISG la plus importante dans l'établissement et le maintien d'une désensibilisation à long terme (**Figure 20**). Lors de l'ISGylation, ISG15 est liée de manière covalente à des protéines et rappelle le

mécanisme d'ubiquitination. USP18 permet le retrait d'ISG15 : on parle de déISGylation³⁰³. Indépendamment de ce processus, elle induit un arrêt prolongé de la signalisation JAK/STAT en se liant à la partie intracellulaire de IFNAR2 ce qui déplace JAK1 et entraîne des changements de conformation dans les domaines extracellulaires d'IFNAR2. Le récepteur développe alors une affinité réduite à l'IFN de type I et induit une signalisation moindre en aval. Cette liaison est spécifique d'IFNAR2 et USP18 n'interfère donc pas avec la signalisation des IFN de type II et III. Toutefois, les IFNs de type I induisent des réponses différentes via le même récepteur puisque la signalisation de l'IFN α est bloquée tandis que l'IFN β continue à activer la voie JAK/STAT³⁰⁴. En effet, les changements de conformation induits par USP18 provoquent un différentiel d'affinité de ces IFNs au récepteur.

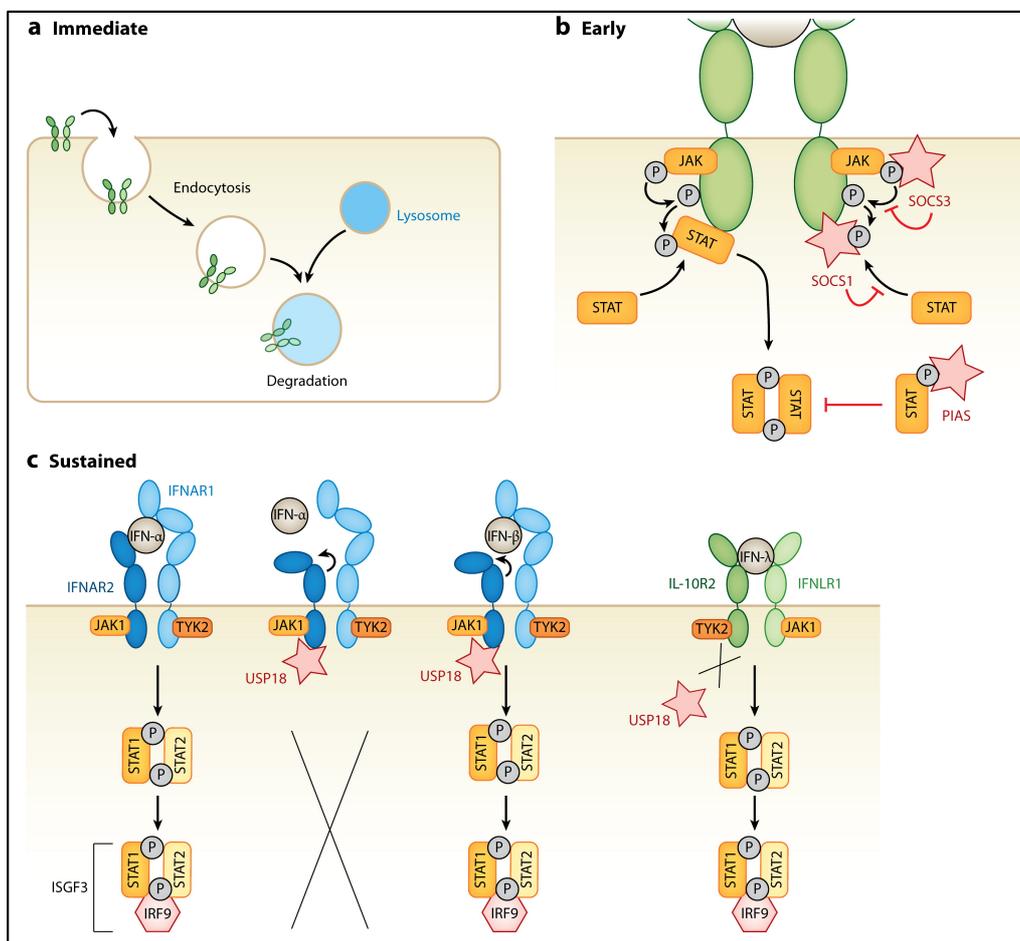


Figure 20. Les voies de désensibilisation à l'IFN. La signalisation de l'IFN est négativement régulée par différents mécanismes. Le mécanisme immédiat correspond à l'endocytose et au recyclage des récepteurs à l'IFN, qui réduisent rapidement la signalisation JAK/STAT (a). Un autre mécanisme précoce requière la synthèse *de novo* d'inhibiteurs protéiques tels que les SOCS ou les PIAS qui empêchent la phosphorylation des STATs ou inhibent les STATs phosphorylés ce qui va induire une altération du signal (b). Enfin, ubiquitin-specific peptidase 18 (USP18), codé par un IFN-stimulated gene (ISG), permet un arrêt soutenu de la signalisation JAK/STAT en se fixant sur la partie intracellulaire d'IFNAR2. Cette fixation induit des changements de conformation dans la partie extracellulaire du récepteur, une affinité plus faible de l'IFN α à son récepteur et donc une diminution de la signalisation. Toutefois, l'IFN β , dont l'affinité au récepteur est plus forte, peut toujours se fixer et initier la signalisation. USP18 se fixe spécifiquement à IFNAR2 et n'interfère donc pas avec la signalisation de type II ou III (c). Pour revue: Schneider, W *et al.* Annu. Rev. Immunol. 2014.

4.5.4 Les activités biologiques de l'IFN α

4.5.4.1 L'IFN α , une molécule immunomodulatrice

L'IFN α stimule l'activité cytotoxique des lymphocytes T et des macrophages dans le but d'éradiquer les cellules infectées ou malignes. Il induit la différenciation rapide des monocytes en cellules dendritiques qui sont particulièrement efficaces dans la reconnaissance d'antigènes et l'induction de l'immunité acquise médiée par les lymphocytes B et T. Dans les LMC, l'exposition à l'IFN α induit une différenciation des progéniteurs vers les cellules dendritiques *in vitro* et *in vivo*³⁰⁵, qui servent de cellules présentatrices d'antigène pour les peptides immunogènes dérivés de l'oncogène de fusion *BCR-ABL*. En parallèle, ces cellules dendritiques sont capables de promouvoir l'amorçage des lymphocytes T CD8⁺.

Le peptide PR1 présenté par le complexe HLA-A2 dérive de la protéinase 3 (P3) et de l'élastase neutrophile et a été retrouvé comme cible potentielle des lymphocytes T dans plusieurs leucémies myéloïdes, dont 75% des LMC³⁰⁶. De fait, une augmentation des lymphocytes T cytotoxiques (PR1-CTL, PR1-specific cytotoxic T-cells) a été corrélée à la réponse moléculaire dans les LMC (20-25%) traitées par l'IFN α , bien qu'ils ne soient pas détectés chez les patients en rechute malgré un traitement constant³⁰⁷. L'IFN α peut aussi activer les lymphocytes T cytotoxiques spécifiques des cellules de LMC et contribuer à une rémission cytogénique complète même après l'arrêt du traitement, prolongeant ainsi la rémission dans les LMC³⁰⁸.

Plusieurs autres antigènes –PV65, PV13, MPD5- ont été identifiés dans un sous-groupe de PV traitées à l'IFN α et l'augmentation de leur régulation sous traitement provoque des réactions immunitaires chez ces patients³⁰⁹. Toutefois, l'immunogénicité de *JAK2*^{V617F} reste très débattue bien que celle de CALR semble diminuer l'immunité puisqu'elle induit une diminution du complexe responsable du chargement des peptides sur les CMH-I³¹⁰.

L'IFN α mobilise aussi en périphérie les lymphocytes T régulateurs (T-regs) de la moelle ce qui induit une diminution de leur effet immunosuppresseur dans le microenvironnement médullaire, suggérant leur implication dans la disparition des clones malins, notamment le clone *JAK2*^{V617F} dans les PV traitées à l'IFN α ³¹¹.

Toutes ces observations témoignent du rôle de l'IFN α dans la production des cellules dendritiques et dans leur activité anti-tumorale ainsi que dans l'immunité médiée par

les lymphocytes T, dévoilant son potentiel thérapeutique majeur dans des stratégies d'immunothérapie anti-cancéreuse.

4.5.4.2 L'IFN α , une molécule anti-angiogénique

L'IFN α est aussi connu comme répresseur angiogénique puissant puisqu'il inhibe l'expression génique du bFGF (basic fibroblast growth factor), de l'IL-8 et du VEGF (vascular endothelial growth factor). Le profil d'expression génique des cellules endothéliales stimulées par l'IFN α dénote d'une augmentation de l'expression de facteurs anti-angiogéniques tels que CXCL9, 10 et 11. De plus, l'altération de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales induite par l'IFN α peut être attribuée à son potentiel anti-angiogénique³¹². Globalement, les patients atteints de LMC et de TE présentent une augmentation de l'activité angiogénique ainsi qu'un niveau élevé de VEGF circulant dans le sérum. De plus, les LMC traitées à l'IFN α présentent un niveau de VEGF plus faible que les patients traités à l'HU ou non-traités, ce qui illustre bien les propriétés anti-angiogéniques puissantes de l'IFN α ³¹³.

4.5.4.3 L'IFN α , une molécule impactant le cycle cellulaire

L'inhibition de la croissance cellulaire est l'une des caractéristiques principales de l'IFN α . Le bon déroulement du cycle cellulaire est fortement dépendant de l'activation et de la formation des CDK (Cyclin-Dependent Kinase) et des complexes de cyclines. Dans une lignée macrophagique murine, l'IFN α induit l'arrêt en phase G1 et l'augmentation de l'expression de p19 et p21, des inhibiteurs de CDK (CDKi), accompagnée d'une diminution de l'activité des complexes D1/CDK4 et E/CDK2. De la même manière, un arrêt en G1 et une augmentation de l'expression de p15 et p21 ont été observés après traitement à l'IFN α dans des lignées lymphoïdes humaines Daudi et U-266. Toutefois, les cellules peuvent échapper à l'inhibition de croissance induite par l'IFN α en empêchant la traduction de l'ARNm de CDKi, le niveau d'ARNm de p21 étant élevé sans que celui de la protéine soit altéré dans les lignées H9³¹⁴.

L'IFN α peut aussi emprunter d'autres voies dans le but d'inhiber la croissance cellulaire. CrkL –comme c-Crk, Grb-2, Nck- appartient à la famille des protéines adaptatrices qui lient les récepteurs aux tyrosines phosphorylées ou leurs substrats - à d'autres éléments de signalisation en aval. Dans les lignées Daudi et U-266,

l'IFN α induit l'activation de TYK2 et phosphoryle la tyrosine de CRKL qui interagit avec C3G, un facteur échangeur de guanine pour RAP-1, petite GTPase qui est un antagoniste de la signalisation RAS. Ainsi, CRKL permet la liaison entre IFNAR et C3G-Rap-1-RAS, et facilite l'inhibition de croissance³¹⁵. L'ajout d'un oligonucléotide anti-sens de *CRKL* empêche les effets inhibiteurs de l'IFN α sur les BFU-E et CFU-GM issus de CD34⁺ de donneurs, ce qui témoigne bien de l'implication de CRKL dans les effets antiprolifératifs de l'IFN α ³¹⁶.

La mégacaryopoïèse induite par la TPO est aussi réprimée par l'IFN α au niveau des progéniteurs mégacaryocytaires humains Lin⁻CD41⁺. En effet, l'IFN α induit l'expression de SOCS-1 qui interrompt la signalisation MPL-JAK2-STAT3 médiée par la TPO et réprime ainsi la mégacaryopoïèse¹⁴⁸. Au contraire, d'autres études ont montré que l'IFN α n'altère pas la prolifération de progéniteurs mégacaryocytaires humains dérivés de CD34⁺ mais agit au niveau de la formation des proplaquettes en provoquant la diminution du nombre de plaquettes en culture issus de mégacaryocytes du fait d'une expression dérégulée de facteurs de transcription impliqués dans les dernières étapes de la mégacaryopoïèse -GATA-1, VWF, NF-E2 et MafG- et expliquant la thrombocytopénie retrouvée chez les patients traités³¹⁷. Les effets myélosuppresseurs de l'IFN α peuvent s'expliquer par le fait que son exposition dans les cellules stromales de la moelle diminue drastiquement la régulation de la production de facteurs de croissance (GM-CSF, IL-1) et agit même contre l'IL-1 en induisant l'expression de l'antagoniste de son récepteur (IL-1RA), réduisant ainsi l'activité hématopoïétique³¹⁸.

L'IFN α inhibe la pousse des progéniteurs érythroïdes, granulocytaires, et mégacaryocytaires des PV et MFP *in vitro*³¹⁹. Cette inhibition est plus efficace sur les CFU-GM et les BFU-E issus des CD34⁺ de PV JAK2^{V617F} que sur les contrôles et plus fréquemment associée aux clones homozygotes (97%) qu'hétérozygotes JAK2^{V617F} (53%), suggérant aussi un rôle sélectif de l'IFN α et dépendant de la dose de JAK2^{V617F} dans le traitement des NMP. Cette inhibition de la pousse des progéniteurs se fait via l'induction de P53 et ses effecteurs comme P21 qui agit sur le cycle mais également induit l'apoptose via les effecteurs apoptotiques BAX, PUMA et NOXA³²⁰.

Un effet paradoxal de l'IFN α sur la prolifération des CSH a aussi récemment été mis en évidence. Dans les modèles murins, une exposition à l'IFN α à court terme

amplifie le compartiment CSH et à long terme induit une prolifération couplée à une différenciation mais pas à un auto-renouvellement, compromettant la reconstitution et menant alors à l'épuisement des CSH^{321,322}. L'équipe d'Essers a montré que l'IFN α permettait la prolifération des CSH via une signalisation accrue de STAT1 qui, à son tour, augmente la régulation de Sca-1. L'activation des CSH induit aussi la voie PI3K au vu de la répression de PTEN, un régulateur négatif de la voie, et de l'augmentation de la phosphorylation d'AKT. En effet, les souris STAT1^{-/-} traitées à l'IFN α expriment une phosphorylation atténuée d'AKT suggérant qu'au moins une partie de la voie PI3K est en aval de la voie IFNAR-STAT1. Les analyses microarrays sur les cellules SLAM traitées à l'IFN α révèlent aussi une augmentation de l'expression des régulateurs du cycle cellulaire CDK7 et CCNB2 ainsi qu'une diminution de l'expression d'ELAV11, le répresseur de p21³²¹. Parallèlement, l'équipe de Sato a constaté une expression augmentée de p21 et une diminution de celles de p27 et p57 dans les CSH de souris traitées à l'IFN α , pour lesquelles il y a une diminution de l'expression transcriptionnelle de c-Mpl qui est impliqué dans la quiescence des CSH, témoignant de l'impact de la perte des CSH dans la réponse atténuée de la Tpo³²². Ainsi, l'IFN α supprime d'une certaine manière la production sanguine tout en induisant paradoxalement la prolifération des CSH.

Plus récemment, Pietras *et al.* a montré que cette prolifération est transitoire et est la conséquence d'un bref relâchement des mécanismes de quiescence en réponse à une exposition aiguë à l'IFN α *in vivo*. Toutefois, après une exposition chronique, les CSH retournent facilement en quiescence où elles ne s'épuisent pas et sont protégées du stress réplicatif à moins qu'elles ne ré-entrent en cycle auquel cas elles activent un programme pro-apoptotique dépendant de p53. Dans ce contexte, la quiescence agit comme un mécanisme de sauvegarde dans le but d'assurer la survie des CSH. Ainsi, l'IFN α permet un certain équilibre apoptotique des CSH en induisant une mort cellulaire directe seulement en cas de prolifération active, expliquant ses effets supprimeurs sur la fonction des cellules souches³²³.

Selon les études, le rôle de l'IFN α est également controversé dans le contexte JAK2^{V617F}, soit par l'augmentation de la prolifération de CSH associée à celle des gènes du cycle cellulaire et par une diminution des gènes de quiescence soit par une augmentation de l'apoptose, du moins dans la rate^{324,325}.

Au final, l'IFN α active plusieurs voies de signalisation afin d'inhiber ou d'induire le cycle cellulaire et la prolifération cellulaire de manière non-exclusive.

4.5.4.4 L'IFN α , une molécule pro-apoptotique

L'IFN α est rapporté tantôt comme protecteur, tantôt comme inducteur des mécanismes d'apoptose. En effet, dans les leucémies lymphoblastiques B chroniques (LLC-B), l'IFN- α augmente l'expression de Bcl-2 et protège ainsi les cellules de l'apoptose³²⁶. A l'inverse, dans les lignées cancéreuses de cellules squameuses de la peau traitées à l'IFN α , l'apoptose induite est partiellement dépendante de l'expression de Bcl-2 puisque sa surexpression confère une résistance partielle à l'apoptose³²⁷. Cette disparité d'action de l'IFN α reste pour l'heure inconnue mais semble dépendante du type cellulaire, de l'environnement ou de facteurs sécrétés par les cellules d'intérêt. Des analyses microarrays ont permis l'identification de plusieurs ISGs directement ou indirectement induites et impliquées dans l'apoptose : caspase-4, -8, TRAIL (Tumor necrosis-Related Apoptosis-Inducing Ligand), Fas/FasL, la kinase DAP (Death-Activating Protein), IRFs, XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein), ds-RNA activated protein kinase, PML (acute ProMyelocytic Leukemia) ainsi que RID (regulator of IFN induced Death)³²⁸.

Des études biochimiques montrent aussi que l'inhibition par l'IFN α de la croissance des cellules progénitrices hématopoïétiques s'accompagne d'une phosphorylation de p38/MAPK et MNK-1 dans les CD34⁺ de PV et que le blocage de cette voie restaure la prolifération des BFU-E et CFU-GM inhibée par l'IFN α ^{320,321}.

Enfin, la P53 induite par l'IFN α est un facteur apoptotique important dans les CPSH JAK2^{V617F}. L'association de l'IFN α avec des antagonistes de MDM2 en thérapie s'est avérée synergique, particulièrement au niveau des CSH^{330,331}. La voie JAK2/STAT est donc liée à l'IFN α puisque MDM2 est une cible de JAK2^{V617F}. De plus, BCL-XL induit par JAK2^{V617F} pourrait limiter l'apoptose induite par l'IFN α dans les CPSH et l'utilisation de l'inhibiteur de Bcl-2 et BCL-XL (ABT-737) entraîne la potentialisation de l'action de l'IFN α ³³². Enfin, une induction de l'apoptose par l'IFN α est rapportée dans les lignées de myélomes U266 à travers la voie PI3K/mTOR³³³. Toutes ces voies peuvent agir de manière non exclusive dans le but de conduire à l'apoptose induite par l'IFN α .

4.5.5 L'IFN α dans le traitement des NMP

La première étude sur le traitement à l'IFN α dans les LMC date de 1987, dans laquelle une réponse hématologique complète est observée chez 71% des patients de la cohorte avec une rémission cytogénique considérable³³⁴. Dans les années 1990, l'IFN α est un bon choix de traitement puisqu'il est associé à une survie plus longue et à une progression retardée de la maladie, comparativement aux thérapies conventionnelles³³⁵. Toutefois, les patients sous IFN α rencontrent des effets secondaires importants : dépression, problèmes gastro-intestinaux et perturbations neurologiques. Plus tard, l'avènement de l'imatinib, un inhibiteur spécifique de BCR-ABL, permet l'évolution des thérapies contre la LMC en induisant une meilleure réponse hématologique et moléculaire³³⁶, bien que les études sur le long terme aient montré des cas de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase et donc une absence de rémission moléculaire complète chez certains patients³³⁷. Depuis, l'IFN α est de nouveau utilisé dans les études cliniques sur les LMC en combinaison avec d'autres inhibiteurs de tyrosine kinase, ou comme stratégie de maintenance après ces inhibiteurs. Ainsi, l'imatinib couplé à l'IFN- α -2a pégylé permet une réponse moléculaire plus importante que l'imatinib seul³³⁸, d'autant que cette combinaison suivie par l'IFN- α -2a seul permet une rémission moléculaire complète dans 75% des cas, après 2 ans et demi d'arrêt de l'imatinib³³⁹.

En 1988, les premières études sur l'IFN α dans les PV/TE dévoilent une suppression de la myéloprolifération ainsi qu'une correction du prurit et d'autres symptômes classiques^{340,341,342}. Depuis, beaucoup d'initiatives ont été entreprises pour tester l'IFN α en clinique par le biais de deux formes commerciales disponibles -l'IFN- α -2a et l'IFN- α -2b- sans évidence biologique d'une efficacité plus importante de l'une ou de l'autre. La plupart des études sur l'IFN α dans les PV/TE montre une normalisation du compte plaquettaire, de l'érythrocytose, de la leucocytose, de la splénomégalie et donc une réponse hématologique dans 80% des cas et 60% des PV deviennent indépendantes des phlébotomies. Néanmoins, 25% des patients souffrent toujours des complications du traitement : problèmes gastro-intestinaux, souffrance musculaire, fatigue, dépression, symptômes grippaux.

Paradoxalement, le taux de réponse dans les MF est moindre: seulement 30% des patients connaissent des effets bénéfiques sur la splénomégalie. La toxicité du

traitement, menant à une aggravation de la cytopénie, est aussi plus importante dans les MF que dans les PV/TE ce qui mène à un arrêt du traitement dans 50% des cas. Au vu de ces résultats préconisant fortement l'IFN α dans le traitement des PV/TE, la question se pose alors quant à son efficacité à éradiquer le clone malin. En effet, les NMP étant des maladies des CSH, la CSH mutée est donc la cible privilégiée de toute thérapie qui se veut capable d'éradiquer la maladie dans son intégralité.

Les analyses basées sur l'inactivation du chromosome X dans des PV traitées à l'IFN α ont montré que ce traitement était capable de rétablir une hématopoïèse polyclonale³⁴³ et que certains patients observaient une réponse hématologique avec une disparition de marqueurs cytogéniques^{344,345,346}, premiers indices d'une action sélective de l'IFN α sur le clone malin.

Par la suite, la découverte de JAK2^{V617F} a fourni un excellent moyen de mesurer l'activité de l'IFN α sur les clones mutés. Parallèlement, le développement de l'IFN- α -2a pégylé a permis une réponse hématologique plus marquante et une toxicité plus faible (5 à 10% d'intolérance) qu'avec l'IFN- α -2a classique, ce qui le rend plus conforme à traiter la maladie. Globalement, environ 90% des patients sont en rémission hématologique complète (RHC) et environ 20% en rémission moléculaire complète (RMC), en se basant sur la quantification de JAK2^{V617F} au niveau des granulocytes circulants^{347,348,349}. Une autre étude révèle 81% de répondeurs hématologiques (dont 38% en RHC), et 34% de répondeurs moléculaires (dont 6% en RMC avec un taux de JAK2^{V617F} indétectable) dans les TE ainsi que 54% de RHC et 14% de RMC dans les PV dont la tolérance s'élève à 90 μ g/semaine³⁵⁰. Cependant, la culture de progéniteurs érythroïdes provenant de la moelle de 4 patients en RHC, en RMC et sans traitement depuis 18 à 40 mois a montré une pousse de CEE et la présence de clones PV JAK2^{V617F} résiduels suggérant un ciblage incomplet des cellules mutées³⁵¹.

Des études récentes ont également montré que l'IFN- α -2a pégylé induisait une réponse hématologique (86%) et moléculaire (65%) dans les TE mutées CALR, avec toutefois des cinétiques différentes de celles mutées JAK2^{V617F}^{352,353}.

Enfin, dans une cohorte de 18 MF, l'IFN- α -2a pégylé corrige rapidement la thrombocytose, la leucocytose et l'anémie chez 80% des patients. De plus, 33% acquièrent une réponse hématologique complète et les effets secondaires sont tolérables (11% ont arrêté le traitement)³⁵⁴. Quant à l'IFN- α -2b, un traitement

prolongé à faible dose altère l'histologie médullaire avec une reprise de l'architecture médullaire, une amélioration de la dysmégacaryopoïèse, ainsi qu'une disparition des fibres de réticuline et de collagène chez les jeunes MFP³⁵⁵.

Ainsi, ces travaux reflètent un temps d'acquisition de la RHC -quelques semaines- plus rapide que la RMC –une année- et soulignent une action sélective et rapide sur le clone JAK2^{V617F} homozygote au détriment de l'hétérozygote³⁵⁶ et sur les clones mutés CALR, bien qu'elle soit plus controversée sur ces derniers^{352,353}. Un traitement à long terme est quoi qu'il en soit nécessaire pour atteindre la RMC.

La réduction et l'élimination des clones JAK2^{V617F} ou CALR^{mut} sont donc bien corrélées avec la réponse hématologique dans les PV/TE. Toutefois, une hématopoïèse clonale peut persister³⁵⁷ chez laquelle des événements génétiques associés précèdent les mutations en lien avec des voies de signalisation^{211,358}. En effet, chez un patient présentant les deux mutations, l'IFN α élimine le clone JAK2^{V617F}/TET2^{mut} mais n'affecte pas le clone TET2^{mut} sans mutation de JAK2^{V617F}³⁵¹. Le nombre de mutations associées ainsi que l'ordre et le type des mutations peut donc influencer la réponse moléculaire^{348,351,352}. Néanmoins, même si le clone malin n'est pas complètement éradiqué, le traitement à l'IFN α à long terme est suffisant pour acquérir une RHC durable même après l'arrêt du traitement, et permet donc une transformation profonde de la maladie.

Bien que l'HU reste le traitement de première intention des PV/TE, le risque de développer une leucémie associée à son utilisation ou à celle d'autres agents cytoréducteurs n'est pas négligeable³⁵⁹. De ce fait, le traitement à l'IFN α -qui est admis comme non leucémogène- est parfois plus judicieux et est souvent préconisé en première intention lorsque les patients sont jeunes³⁶⁰.

L'exposition prolongée à faible dose d'IFN α induit une forte proportion de RMC dans les PV/TE, ce qui n'avait encore jamais été observé avec les autres traitements. De plus, il provoque une forte réponse hématologique et histologique avec une toxicité modérée, ce qui en fait une drogue non-leucémogène de qualité dans le traitement des NMP mais dont le mécanisme reste partiellement incompris.

Dans les modèles murins JAK2^{V617F}, il a été montré que, y compris par notre laboratoire, l'IFN α ciblait les CSH et les cellules initiatrices de la maladie après greffe secondaire de la moelle des souris traitées. Le mécanisme reste imprécis puisque Mullally montre que l'IFN α épuise le compartiment des CSH en induisant le cycle

cellulaire alors que notre groupe suggère plutôt une mort par apoptose des CSH JAK2^{V617F} 324,325. Ainsi, l'IFN α permet une rémission moléculaire en ciblant les CSH. Néanmoins, aucune étude n'a examiné précisément l'effet de l'IFN- α *in vivo* chez l'Homme et de manière concomitante sur les CSH et sur les cellules matures de patients mutés CALR ou JAK2^{V617F} ainsi que les cinétiques de ciblage. Ma thèse s'inscrit entre autre dans l'optique d'évaluer cet effet sur plusieurs compartiments hématologiques tels que les progéniteurs enrichis en CSH dans le but de prédire la réponse des patients, et d'éviter le traitement aux futurs non-répondeurs.

Revue

Mosca M, Vertenoel G, Toppaldoddi KR, Plo I, Vainchenker W. « *Aspects biologiques de la voie JAK/STAT dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques négatifs pour BCR-ABL* ». ***Bulletin du Cancer***, 2016.

Aspects biologiques de la voie JAK/STAT dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques négatifs pour BCR-ABL

Matthieu Mosca^{1,2,3*}, Gaëlle Vertenoel^{4,5*}, Katte Rao Toppaldoddi^{1,2,3},
Isabelle Plo^{1,2,3}, William Vainchenker^{1,2,3}

1. Inserm UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France
2. Université Paris-Saclay, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France
3. Gustave Roussy, UMR 1170, Villejuif, 94805, France
4. Signal Transduction & Molecular Hematology Unit, Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels B-1200, Belgium
5. De Duve Institute, Université catholique de Louvain, Brussels B-1200, Belgium

* ont également participé

Correspondance

William Vainchenker, Inserm UMR U1170, Gustave Roussy, 114, rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France
william.vainchenker@gustaveroussy.fr

Mots clés

Néoplasmes
myéloprolifératifs
JAK2V617F
Calréticuline
MPL
Mutations
d'épigénétique

■ Résumé

Les syndromes myéloprolifératifs appelés maintenant les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) comportent plusieurs entités cliniques : la leucémie myéloïde chronique (LMC), les NMP classiques incluant la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primaire (MFP) et les NMP atypiques et inclassables. Le terme de NMP est le plus souvent utilisé pour les syndromes myéloprolifératifs classiques négatifs pour *BCR-ABL* (TE, PV, MFP). Ce sont des maladies clonales résultant de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique et aboutissant à la production anormale de cellules myéloïdes. Les anomalies génétiques responsables de cette myéloprolifération sont appelées des anomalies « drivers ou motrices » et ont toutes pour conséquence des dérégulations de la voie des récepteurs aux cytokines/JAK2/STAT. Parmi elles, les mutations de *JAK2*, du récepteur à la thrombopoïétine (*MPL*) et de la calréticuline (*CALR*) sont retrouvées dans environ 90% des cas. Ces mutations motrices des NMP peuvent être associées à d'autres mutations également trouvées dans d'autres hémopathies malignes, surtout dans les MFP. Ce sont des maladies chroniques dont les risques majeurs sont les thromboses, les hémorragies et les cytopénies pour les MFP et à plus long-terme la progression vers une myélofibrose et la transformation vers des leucémies. Les thérapeutiques récentes se sont focalisées sur le ciblage de la voie de signalisation JAK2 directement par des inhibiteurs de JAK2 ou indirectement. L'interféron α est également utilisé et permet dans certains cas une rémission hématologique et moléculaire des patients.

Keywords

Myéloproliférative
neoplasms
JAK2V617F
Calreticulin
MPL
Epigenetic mutations

■ Summary**Biological aspects of JAK/STAT signaling in BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms**

Myeloproliferative disorders more recently named Myeloproliferative neoplasms (MPN) display several clinical entities: chronic myeloid leukemia (CML), the classical MPN including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), primary myelofibrosis (PMF) and atypical and unclassifiable NMP. The term MPN is mostly used for classical *BCR-ABL*-negative (*myeloproliferative disorder*) (ET, PV, PMF). These are clonal diseases resulting from the transformation of an hematopoietic stem cell and leading to an abnormal production of myeloid cells. The genetic defects responsible for the myeloproliferative abnormalities are called « driver » mutations and all result in deregulation of the cytokine receptor / JAK2 / STAT axis. Among them, *JAK2*, the thrombopoietin receptor (*MPL*) and calreticulin (*CALR*) mutations are found in around 90% of the cases. These driver MPN mutations can be associated with other driver mutations also found in other hematological malignancies, especially in PMFs. These are chronic diseases with major risks being thrombosis, hemorrhage and cytopenias for PMF and the long-term progression to myelofibrosis and the transformation to leukemia. Most recent therapeutic have focused on targeting the JAK2 signaling pathway directly by inhibitors of JAK2 or indirectly. Interferon α allows in some cases hematologic and molecular remission patients.

Introduction

Les syndromes myéloprolifératifs appelés maintenant les néoplasmes myéloprolifératifs ou plus rarement néoplasies myéloprolifératives (NMP) comportent quatre entités cliniques : la leucémie myéloïde chronique (LMC), les NMP classiques incluant la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), et la myélofibrose primaire (MFP). En fonction de la classification, d'autres maladies étroitement liées peuvent être incluses comme la mastocytose systémique ou l'hyperéosinophilie idiopathique et la leucémie à polynucléaire neutrophile. Le terme de NMP est le plus souvent utilisé pour les syndromes myéloprolifératifs classiques négatifs pour *BCR-ABL*. Ce sont des maladies clonales résultant de la transformation d'une cellule souche hématopoïétique (CSH), cette transformation est associée à une hypersensibilité ou à une indépendance aux cytokines, qui est la caractéristique biologique des NMP. Il en résulte une surproduction de cellules myéloïdes. Les anomalies génétiques responsables de cette myéloprolifération sont appelées des anomalies *drivers* ou motrices. Les mutations motrices réellement responsables de l'aspect « myéloprolifération » ont toutes pour conséquence des dérégulations de la voie des récepteurs aux cytokines/JAK2/STAT. Ces mutations sont caractéristiques de ces NMP, mais peuvent être retrouvées dans des maladies apparentées comme les anémies sidéroblastiques réfractaires avec thrombocytose. Parmi elles, les mutations de *JAK2*, du récepteur à la thrombopoïétine (*MPL*) et de la calréticuline (*CALR*) sont responsables de 90% des cas. Ces mutations motrices des NMP peuvent être associées à d'autres mutations également trouvées dans d'autres hémopathies malignes et qui touchent les composants de l'épigénétique ou de l'épissage ou certains facteurs transcriptionnels. Elles sont surtout retrouvées dans les MFP. Ce sont des maladies chroniques dont les risques

majeurs sont les thromboses, les hémorragies et à plus long terme la progression vers une myélofibrose pour les PV et les TE ou les cytopénies pour la MFP et la transformation vers des leucémies secondaires. Les traitements classiques se sont avérés efficaces pour la prévention des thromboses, mais peu efficaces sur l'évolution à long terme de ces pathologies. Les thérapeutiques plus récentes se sont focalisées sur le ciblage de la voie de signalisation récepteurs de cytokine / JAK2 directement par des inhibiteurs de JAK2 ou indirectement en bloquant d'autres voies. Ces thérapies améliorent les symptômes de la MFP, mais jusqu'à présent ont peu d'effet sur la progression. L'interféron α (IFN α) est aussi utilisé et permet dans certains cas une rémission hématologique et moléculaire des patients essentiellement dans les PV et les TE.

Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques

Les NMP classiques sont des hémopathies malignes clonales dues à la survenue d'anomalies génétiques au niveau des CSH, responsables de la production exagérée d'une ou plusieurs lignée(s) myéloïde(s). Elles incluent la PV, la TE et la MFP [1]. Tous les NMP excepté la MFP sont associés à une myéloprolifération pure, sans dysplasie, conduisant à une augmentation de la production de cellules sanguines matures, qui prédomine généralement sur une lignée. Trois lignées hématopoïétiques sont principalement touchées : i) la lignée mégacaryocytaire / plaquettaire dans la TE, ii) la lignée érythrocytaire dans la PV, iii) les lignées mégacaryocytaires et granuleuses dans la MFP. Ces trois maladies peuvent évoluer de l'une vers l'autre à plus ou moins long terme, mais généralement de façon très lente sur des dizaines d'années. Notamment, la TE peut progresser soit directement vers la MF soit évoluer en PV puis en MF. La PV

peut également évoluer vers la MF. Ainsi, les données actuelles montrent que ces maladies sont en continuum [2]. La MFP est la forme la plus avancée et sévère de NMP par définition associée à une fibrose médullaire et le plus souvent à une hématopoïèse extramédullaire et une splénomégalie. Elle est considérée par certains comme l'équivalent d'une forme subaiguë de NMPs. Les complications des NMP classiques comportent des risques accrus de thrombose artérielle ou veineuse et la progression possible vers la leucémie. La fréquence de développement de celle-ci est très variable et dépend du type de NMP allant de 1 % dans la TE, 4 % dans la PV et 20 % dans la MFP sur une période de 10 ans. Ces chiffres sont actuellement discutés, et dépendent des traitements mais le risque augmente encore beaucoup après 10 ans [3]. Ainsi, les NMP peuvent être considérés comme la phase initiale ou pré-leucémique d'une leucémie. Leur étude détaillée est importante pour comprendre les mécanismes de la leucémogénèse allant de l'initiation à la progression, ce d'autant que les données récentes suggèrent que la plupart des leucémies sont précédées d'une longue phase d'hématopoïèse clonales.

Le panorama des anomalies génétiques responsables de ces NMP est connu en grande partie grâce notamment aux technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS). Les anomalies responsables de la myéloprolifération des NMP classiques affectent la voie de signalisation récepteur de cytokine/JAK2/STAT et comprennent trois grands groupes : ceux mutés pour *JAK2*, ceux mutés pour le récepteur à la thrombopoïétine (*MPL*) et ceux mutés pour la calréticuline (*CALR*) [4, 5].

Rôle physiologique de la voie JAK/STAT

Les Janus kinase (JAK)

La famille des JAK regroupe 4 membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ce sont des protéines cytoplasmiques à activité tyrosine kinase non-récepteur [6]. Elles sont fixées aux récepteurs de cytokines de type I et II qui sont dépourvus d'activité enzymatique, afin de permettre la transduction du signal. Ces protéines sont caractérisées par 7 domaines présentant des similarités de séquence, appelés JH1-JH7 (*JAK homology*) et organisés en 4 grands domaines. En N-terminal (JH7 à JH5) se trouve un premier domaine appelé FERM (Band-4.1, ezrine, radixine, et moésine) qui permet la liaison à la « box 1 » située dans la région juxta-membranaire du récepteur de la kinase associée. Au niveau de JH3 et JH4 se situe un deuxième domaine d'homologie à SH2 (*Src Homology 2*) qui est structurellement important pour la spécificité d'interaction avec le récepteur et pour la liaison à des résidus tyrosines phosphorylés d'autres protéines. La région C-terminale contient deux domaines conservés : le domaine catalytique JH1 et le domaine JH2 ou domaine pseudokinase, qui régule négativement JH1. L'interaction entre les domaines JH1 et JH2 est nécessaire à une activation optimale de JAK2. Bien que le JH1 contienne le domaine de liaison à l'ATP, le JH2 est également capable de le fixer [7]. De plus, le JH1 possède un site catalytique (boucle d'activation).

Axe de signalisation récepteurs / JAK2 / STAT

Il existe différentes associations entre les JAK et les récepteurs de cytokines selon le type cellulaire. En ce qui concerne les NMP, trois lignées myéloïdes sont principalement touchées : les lignées érythrocytaire, mégacaryocytaire et granuleuse. Les principaux récepteurs qui gouvernent la différenciation de ces lignées hématopoïétiques sont les récepteurs à la thrombopoïétine (TPO) (*MPL*) pour la lignée mégacaryocytaire, à l'érythropoïétine (EPOR) pour la lignée érythrocytaire et au G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*) (*G-CSFR*) pour la lignée granuleuse. Ces trois récepteurs font partie de la famille des récepteurs homodimériques de type I et sont caractérisés par la présence dans leur partie extracellulaire de 4 résidus cystéine conservés, d'un motif WSXWS et de domaines fibronectine de type III, ainsi que des box1 et 2 dans la partie intracellulaire juxta-membranaire. JAK2 est la protéine kinase qui s'associe principalement à ces récepteurs, même si TYK2 se fixe aussi à *MPL*. L'interaction se fait entre le domaine FERM de JAK2 et la « box » 1 de la partie juxta-membranaire du récepteur.

Tout d'abord, JAK2 joue un rôle de chaperon au niveau du réticulum endoplasmique en se fixant à ces récepteurs favorisant ainsi leur stabilité et leur montée à la surface cellulaire par la voie canonique (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules, membrane plasmique). Une fois ancrée à la surface cellulaire, JAK2 reste associé au récepteur. La fixation de la cytokine (EPO, TPO, G-CSF) sur le récepteur entraîne soit une homodimérisation voir une structure plus complexe (*G-CSFR*), soit des changements conformationnels dans le cas d'homodimère préformé (EPOR ou *MPL*). Ceci provoque l'activation de JAK2 qui s'autophosphoryle au niveau des résidus Y1007 et 1008, situés dans la boucle d'activation du domaine kinase, puis la transphosphorylation des tyrosines conservées dans la partie intra-cytoplasmique des récepteurs, permettant ainsi le recrutement de protéines possédant un domaine SH2, comme des molécules de signalisation impliquées dans les voies STAT, MAPK et PI3K [8]. En ce qui concerne les STAT, ces récepteurs activent principalement STAT1, 3 et 5 mais à différents niveaux. *MPL* active STAT1, 3, et 5 quand EPOR active majoritairement STAT5 et *G-CSFR*, STAT1 et 3. Une fois les STAT phosphorylées, elles s'homo ou hétéro-dimérisent et migrent vers le noyau où elles agissent en tant que facteur de transcription sur des gènes cibles comme p21, PIM1, SOCS1, 3, et CIS. La voie des MAPK est impliquée dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Cette cascade de signalisation est activée via la protéine adaptatrice GRB2, recrutée au niveau du récepteur qui à son tour se lie à SOS et entraîne l'activation de RAS/RAF/MEK/ERK. La voie de la PI3K joue plutôt ici un rôle dans la survie ainsi que dans le contrôle des stress cellulaires. L'activation de la cascade se fait par fixation de la sous-unité p85 de la PI3K au récepteur qui permet l'activation de l'activité catalytique de la p110 et la phosphorylation des protéines d'aval comme AKT, MTOR, S6K ou RSK.

L'activation du signal est ensuite contrôlée très finement par régulation négative pour éviter une sur-signalisation [8]. En particulier, la protéine tyrosine phosphatase SHP1 se lie à la fois

à JAK2 et au récepteur activé provoquant sa déphosphorylation et la terminaison du signal. Les protéines SOCS, en particulier SOCS1 et SOCS3, régulent négativement la signalisation due à JAK2. SOCS1 et SOCS3 peuvent inhiber directement l'activité de JAK2, mais elles peuvent aussi entrer en compétition allostérique avec les STAT pour la liaison au récepteur. Enfin, elles peuvent recruter le complexe ubiquitine ligase et induire la dégradation par le protéasome de JAK2. LNK (codée par *SH2B3*) est aussi une protéine adaptatrice qui permet la régulation négative du signal en inhibant l'activation de JAK2 via EPOR ou MPL. CBL est une E3-ligase qui induit l'ubiquitination de JAK2 et du récepteur associé et entraîne leur dégradation par le protéasome et la voie des lysosomes. Enfin, les PIAS régulent négativement la voie JAK2/STAT par inhibition directe de la liaison des STAT à l'ADN ou en entraînant la sumoylation des STAT.

Ainsi, toutes ces molécules d'activation ou de contrôle de l'axe de signalisation récepteur de cytokine/JAK2/STAT sont susceptibles d'être impliquées dans la pathogenèse des NMP classiques. De fait, il a été identifié dans les NMP classiques, des mutations gain-de-fonction de *JAK2*, de *MPL* et des mutations perte-de-fonction de *LNK* et *CBL*. De façon surprenante des mutations inattendues dans le gène de la *CALR*, une protéine chaperon du réticulum, et sans lien direct avec cette voie, ont aussi été mises à jour ces dernières années.

Mutations de signalisation trouvées dans les NMP (Figure 1)

Mutations JAK2 V617F

La proximité physiopathologique des NMP BCR-ABL négatifs a été mise en exergue par la découverte d'une mutation récurrente de JAK2 au niveau de l'exon 14, la mutation JAK2V617F. Cette découverte est l'œuvre simultanée de différentes équipes, via des approches expérimentales distinctes [9]. La mutation JAK2V617F est retrouvée dans plus de 95 % des cas de PV et de 50 à 60 % des cas de TE et PMF, soit dans plus de 60 % de la totalité des NMPs. Cette mutation résulte du remplacement d'une guanine en thymidine, entraînant la substitution d'une valine par une phénylalanine en position 617, dans le domaine pseudokinase de JAK2, le domaine JH2. La mutation JAK2V617F entraîne une rigidification de l'hélice alpha C de ce domaine JH2, favorisant la transphosphorylation de JH1 et donc l'activation constitutive de JAK2 [10]. Cette modification structurale est liée dans la cas de JAK2V617F à de nouvelles interactions entre les phénylalanines 617 et 595. De manière intéressante, la plupart des mutations oncogéniques de JAK2 (voir mutations de l'exon 12) aboutissent à des modifications structurales proches suggérant qu'il serait possible de développer des inhibiteurs des formes oncogéniques de JAK2. L'activité kinase de JAK2V617F nécessite cependant la présence d'un récepteur homodimérique pour être constitutivement active. *In fine*, JAK2V617F induit en l'absence de cytokine une activation des voies de signalisation d'aval, telles les voies STAT5/3/1, MAPK, PI3K [9]. Parmi ces voies, STAT5 semble prépondérante dans la survenue des NMP car sa présence est nécessaire à la transformation par JAK2V617F dans les

lignées cellulaires comme dans les modèles murins [11]. STAT1 est important pour la mégacaryopoïèse puisque le KO développe un phénotype érythrocytaire [12]. Le KO de STAT3 entraîne une plus grande thrombocytose. Ce résultat inattendu est indirectement liée à une surexpression de STAT1 et une augmentation de son activation [13].

Dans les modèles murins rétroviraux, l'expression de JAK2V617F induit un syndrome myéloprolifératif, essentiellement de type polyglobulie vraie, avec évolution vers une myélofibrose [14]. La sévérité de la maladie varie cependant avec le fond génétique utilisé. Par la suite, dans des modèles transgéniques où le niveau de JAK2V617F est régulé de manière précise, on note le développement d'une maladie de type PV lorsque JAK2V617F est exprimé à des niveaux similaires à ceux de JAK2 endogènes, tandis qu'un phénotype de type TE est observé quand les niveaux de JAK2V617F sont inférieurs à ceux de JAK2 endogène [15]. Ces modèles murins permettent de prouver que la mutation JAK2V617F est suffisante pour induire un syndrome myéloprolifératif chez la souris. Par la suite, 4 modèles plus physiologiques de knock-in de JAK2V617F ont été mis au point [16]. Dans ceux-ci l'expression de JAK2V617F murin à l'état hétérozygote entraîne l'apparition d'un phénotype de type PV, tandis que celle de JAK2V617F humain est associée à une maladie mimant une TE très modérée à l'état hétérozygote et plus une PV à l'état homozygote [17].

Chez les patients, la plupart de ceux atteints de PV ou de MF surtout post-PV ou post-TE portent la mutation à l'état homozygote, suite à une recombinaison mitotique, alors que la plupart des patients atteints de TE sont hétérozygotes pour la mutation JAK2V617F bien que de rares clones homozygotes puissent être détectés [18].

Mutations JAK2 exon 12

Suite à la découverte de la mutation JAK2V617F, des efforts ont été entrepris afin d'identifier les mutations en cause dans les PV, TE et MFP JAK2V617F négatifs. Le séquençage de tous les exons de JAK2 a permis de révéler des mutations gain-de-fonction de JAK2 au niveau de l'exon 12 dans environ 3-4 % des patients JAK2V617F négatifs atteints de PV uniquement [19]. Pratiquement tous les patients atteints de PV présentent donc une mutation au niveau de JAK2, que ce soit au niveau de l'exon 14 (JAK2V617F) ou de l'exon 12. Ces dernières mutations ne surviennent pas dans le domaine pseudokinase de JAK2, mais dans une région hautement conservée, immédiatement adjacente à celui-ci et s'étendant des résidus 536 à 547. Il y a plus d'une trentaine de mutations actuellement décrites, consistant en des substitutions, délétions et duplications. La plus fréquente d'entre elles est la délétion N542-E543.

Sur le plan structural, bien que ne survenant pas dans le domaine pseudokinase de JAK2 mais, dans une région de liaison entre celui-ci et le domaine SH2, les mutations au niveau de l'exon 12 ont un effet similaire à la mutation JAK2V617F. En effet, dans une représentation en 3 dimensions, les résidus concernés se trouvent dans une boucle localisée, comme celle contenant V617, à l'interface entre les domaines kinase et pseudokinase

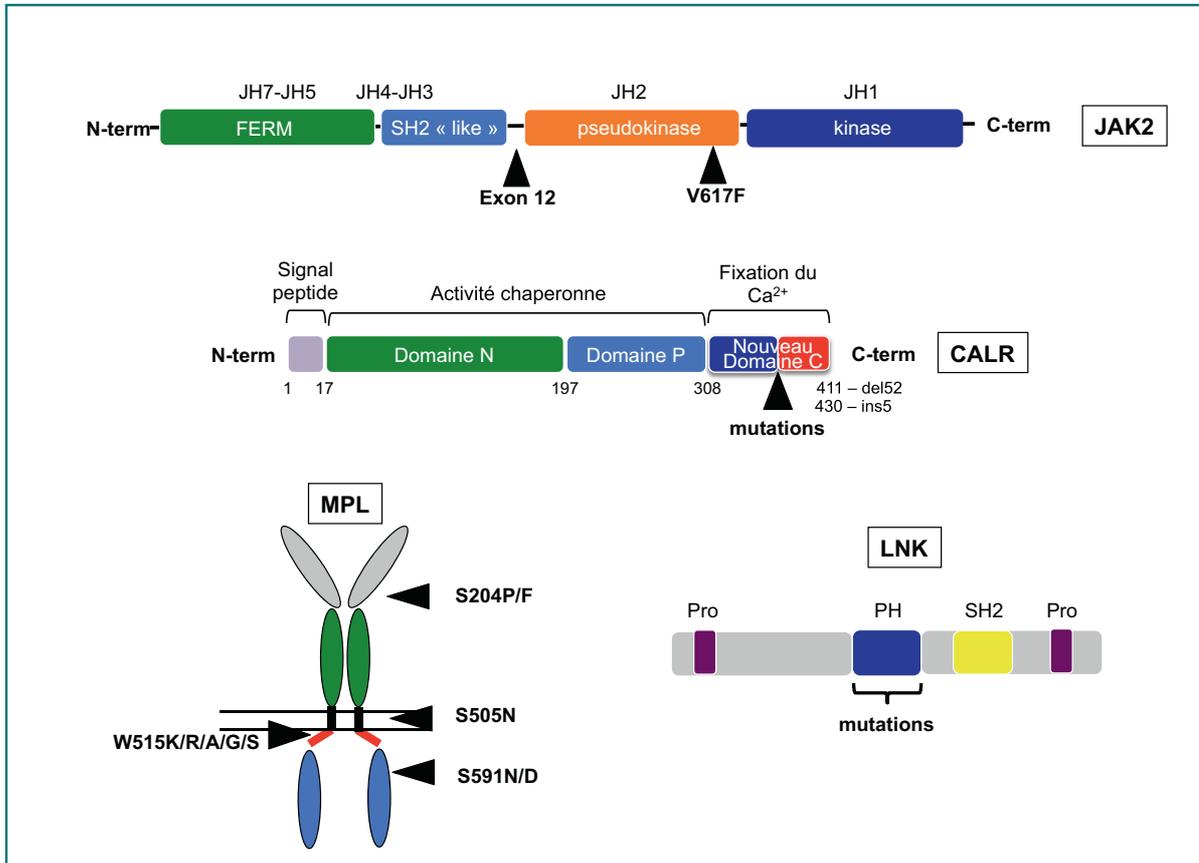


FIGURE 1

Mutations motrices de signalisation identifiées dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP).

Les principales mutations motrices dans les NMP affectent l'axe de signalisation récepteur de cytokine/JAK2/STAT. Les mutations touchent 4 molécules principales : JAK2, MPL, CALR, LNK.

Les mutations de *JAK2* (*JAK2V617F* ou exon 12) expliquent la majorité des PV. *JAK2V617F* est également présente dans les TE et les MFP (55%). Les mutations de *MPL* (3-6%), de *CALR* (25-30%) et de *LNK* (2%) sont exclusivement trouvées dans les TE et MFP. Les mutations de *MPL* touchent principalement le codon W515 mais aussi S505 et plus rarement d'autres codons (S204, Y591). Les mutations de la *CALR* sont nombreuses (plus d'une cinquantaine) mais toutes ont pour conséquence la génération d'une nouvelle séquence en C-terminal quasi identique pour tous les mutants et la perte du signal KDEL de rétention dans le réticulum endoplasmique. Les mutations de *LNK* entraînent des modifications principalement au niveau du domaine PH.

de JAK2. Les différentes mutations pourraient perturber de la même manière l'action inhibitrice du domaine pseudokinase sur le domaine kinase.

Sur le plan clinique, les patients porteurs des mutations de l'exon 12 sont diagnostiqués à un âge plus précoce, et ils présentent un phénotype surtout érythrocytaire, avec un taux d'Hb accru par rapport aux patients *JAK2V617F* tandis que leurs taux de plaquettes et de leucocytes sont généralement normaux ou inférieurs. Cependant, il ne semble pas avoir de différences dans l'évolution clinique de ces patients comparés aux patients *JAK2V617F* en terme de survenue de thrombose, de myélofibrose secondaire et de leucémies aiguës [20]. Les mutations de *JAK2* au niveau de l'exon 12 sont par ailleurs retrouvées dans la majorité des cas à l'état hétérozygote.

Récepteur à la thrombopoïétine – MPL

La mise en évidence des mutations dans le gène de *JAK2* et les éléments de plus en plus concordants concernant l'implication de la voie JAK2/STAT dans les NMP a conduit d'autres équipes à rechercher des mutations dans les récepteurs associés à JAK2, comme MPL, EPOR et G-CSFR. Ceci a permis la mise en évidence d'une mutation gain-de-fonction de *MPL* en position 515, appelée *MPLW515L* [21], induisant chez la souris un NMP caractérisé par une hyperleucocytose, une thrombocytose, une splénomégalie et une fibrose médullaire. Par la suite, d'autres mutations ont été décrites, les mutations W515K/R/A/G/S [22]. Le tryptophane en position 515 fait partie d'un domaine amphipatique situé à la jonction entre les domaines transmembranaire et cytoplasmique de MPL (RWQFP). Il a été démontré qu'il prévient la dimérisation de MPL

en l'absence de cytokine alors que sa substitution par une leucine, lysine, arginine ou alanine, entraîne l'activation constitutive du récepteur [23]. La mutation S505N a également été décrite dans de rares cas sporadiques de TE et de MF bien qu'elle soit surtout décrite dans des cas familiaux [24]. Celle-ci est localisée dans le domaine transmembranaire du récepteur et induit également sa dimérisation et son activation en l'absence de ligand. Enfin de très rares mutations de *MPL* en dehors de l'exon 10 (T119I, S204F, E230G, Y591D/N, S204P) ont récemment été mises en évidence dans les TE et MF dites « triple négatives » [25, 26]. Ces mutations ont une activité gain-de-fonction, mais plus faible que celles des mutations de *MPLW515* et pourraient être associées à d'autres événements moléculaires pour induire le phénotype.

Les mutations de *MPL* sont retrouvées dans environ 5 % des MF et 3 % des TE, la mutation W515L étant la plus fréquente.

Sur le plan clinique, les patients présentant une TE *MPL* mutée ont généralement un âge supérieur au moment du diagnostic, un taux d'hémoglobine plus bas et une thrombocytose supérieure par rapport aux patients *JAK2V617F* [27]. Bien qu'ils semblent présenter des anomalies plus fréquentes de la microcirculation et un risque plus élevé de survenue de thrombose artérielle, il ne semble pas y avoir de différence en termes de survie, d'évolution leucémique ou fibrotique. Les patients atteints de myélofibrose et présentant une mutation de *MPL* sont quant à eux plus souvent des femmes âgées, avec une anémie plus sévère et une plus grande probabilité de devoir bénéficier d'un support transfusionnel régulier [28].

Mutations de *CALR*

En décembre 2013, deux groupes ont rapporté de manière indépendante la découverte de mutations dans l'exon 9 du gène *CALR* et qui consistent en des insertions ou des délétions entraînant un décalage du cadre de lecture [4,5]. Ces mutations de *CALR* ont été trouvées dans plus de 50% des TE et des MFP sans mutation de *JAK2* ou de *MPL* et au total dans environ 25 à 30 % des patients présentant une TE ou une MFP. Ces mutations sont également retrouvées dans les anémies sidérolastiques réfractaires avec thrombocytose (RARS-T), mais avec une fréquence très faible par rapport à *JAK2V617F* [4]. De rares cas de PV ont été décrits, mais souvent associés à une thrombocytose, et dans certains de ces cas il pourrait exister des clones indépendants *JAK2* et *CALR* [4,29,30]. Plus de 50 types de mutations différentes ont été détectées à l'heure actuelle, mais les mutations les plus fréquentes et comptant pour plus de 80-90 % des cas sont soit une délétion de 52 bp (appelée mutation de type 1 ou *CALRdel52*) ou une insertion de 5 bp (ou mutation de type 2 ou *CALRins5*). Ces mutants n'ont pas la même prévalence parmi les TE et les MF : le mutant *CALRdel52* est plus fréquemment associé aux MFP que la *CALR ins5* tandis que la fréquence de ces deux mutations est proche en cas de TE [31]. Ces mutations sont bien responsables du phénotype de la maladie puisque les modèles de souris par transplantation de moelle transduite avec les mutants *CALRdel52* et à un moindre degré *CALRins5*, développent une thrombocytose pure. De plus, les souris *CALRdel52* récapitulent l'évolution vers la myélofibrose.

Ceci est vrai aussi pour la *CALRins5* avec une pénétrance beaucoup plus faible [32]. Ainsi, la myélofibrose pourrait être une évolution naturelle de la TE en cas de mutation de *CALR*.

Toutes les mutations de *CALR* génèrent une protéine mutante avec une nouvelle séquence peptidique C-terminale quasi-identique pour tous les mutants. Ceci aboutit à une région C-terminale positivement chargée dépourvue du motif KDEL, signal de rétention dans le réticulum endoplasmique alors que celle de la *CALR* sauvage est fortement chargée négativement. *A priori*, la *CALR* avait peu de lien avec l'hématopoïèse en général et les NMP en particulier. En effet, il s'agit d'une protéine chaperon du réticulum endoplasmique, qui est impliquée dans le repliement des protéines N-glycosylées, et l'homéostasie du calcium ainsi que dans les réponses immunitaires (via sa capacité à être transloquée à la surface des cellules apoptotiques) [33]. Cependant, il a été montré que la *CALRdel52* active *STAT5* en absence de cytokine dans des lignées cellulaires [4]. Récemment, nos laboratoires et d'autres groupes ont confirmé ces données en montrant que *CALRdel52* et *ins5* activent la voie *JAK2/STAT* en activant spécifiquement *MPL* et à un niveau moindre le *G-CSFR*, essentiellement pour la *CALRdel52*. Ceci se fait par interaction du domaine d'interaction aux lectines (domaine N) de la *CALR* et les sites de glycosylation dans la partie N-terminale de *MPL* [32,34-36]. L'activation des voies de signalisation serait plus liée à l'interaction entre une région particulière de *MPL* et les charges positives de la nouvelle partie C-terminale. De plus, la *CALR* mutante est sécrétée, pouvant potentiellement activer des cellules de l'immunité, voir des cellules hématopoïétiques. *MPL* est également détectée à la surface cellulaire, mais de façon partiellement glycosylée associée aux *CALR* mutantes suggérant une anomalie de maturation et éventuellement d'adressage à la surface.

Sur le plan clinique, les patients atteints de TE et présentant une mutation de *CALR* ont généralement un taux de plaquettes accru, mais auraient un risque thrombotique plus faible que les patients *JAK2V617F* [4]. Par ailleurs, ils présentent une charge allélique très supérieure aux patients présentant une TE *JAK2V617F*, ce qui pourrait suggérer un avantage sélectif des cellules *CALR* mutées au niveau du compartiment des CSH. Les patients *CALR* mutés atteints de MF présentent quant à eux une survie accrue. Ce dernier point est cependant limité aux cas de mutation de type 1 [37].

LNK

Comme mentionné plus haut, *LNK* ou *SH2B3* est une protéine adaptatrice, inhibitrice de la voie *JAK-STAT*. Elle se lie à la tyrosine 813 phosphorylée de *JAK2* via son domaine *SH2* et entraîne l'inhibition de la voie, que celle-ci soit activée par la liaison du ligand à son récepteur (*MPL* ou *EPOR*) ou par les mutations *JAK2V617F* ou *MPLW515*. Les mutations de *LNK* ont été décrites pour la première fois en 2010, chez 2 patients, l'un atteint de MF et l'autre de TE [38]. Par la suite d'autres mutations ont été découvertes, chez des patients atteints de TE, de PV, ainsi que chez des patients atteints d'érythrocytose idiopathique [39]. Ces mutations sont rares en phase chronique des NMP (moins de 2 % des cas), mais semblent

être plus fréquentes lors de la transformation leucémique (13 %). La plupart des mutations décrites surviennent dans le domaine PH, dans un « hot spot » s'étendant des résidus E208 à G234, bien que des mutations en dehors de ce domaine aient également été décrites. Étant donné que ce domaine PH pourrait être impliqué dans la localisation membranaire de la protéine, ceci devrait aboutir à une localisation anormale de la protéine mutée dans le cytoplasme. La plupart des mutations sont trouvées à l'état hétérozygote, la question étant de savoir si cela correspond à une haplo-insuffisance ou à un effet dominant négatif. Les souris *Lnk*^{-/-} présentent un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une thrombocytose, une splénomégalie et une fibrose médullaire tandis que les souris *Lnk*^{+/-} présentent un phénotype intermédiaire, ce qui est en faveur de l'haplo-insuffisance [40]. Cependant, étant donné que le domaine de dimérisation N-terminal demeure intact dans les mutants LNK, ceux-ci pourraient lier et séquestrer la protéine WT dans le cytoplasme, entraînant donc un effet dominant-négatif [38]. Cette dernière étude a également montré que les mutants gardaient la capacité de se lier à JAK2 tandis que leur localisation ne semblait pas affectée, ce qui va à l'encontre de l'hypothèse initialement formulée. En fait, dans un certain nombre de cas, les mutations de *LNK* sont associées à d'autres mutations motrices comme *JAK2V617F*.

Patients triple-négatifs

La majorité des patients présentant un NMP présentent donc des mutations activatrices de la voie JAK-STAT, que ce soit au niveau du récepteur (mutation de *MPL* au niveau de l'exon 10), de *JAK2*

(*JAK2V617F* et au niveau de l'exon 12), de *CALR* (exon 9) ou des régulateurs négatifs de la voie (LNK). Les NMP ne présentant pas de mutation de *JAK2*, de *MPL* ou de *CALR* sont appelés triple-négatifs et représentent de 7 à 10 % des cas. Une étude récente a cependant montré que même ces patients triple-négatifs montrent des signes d'activation de la voie JAK-STAT [41]. Au total, toutes les mutations de signalisation identifiées dans les NMP affectent l'axe *MPL/JAK2/STAT* et sont des mutations dites motrices de la myéloprolifération et de la maladie comme l'ont démontré les nombreux modèles de souris. Toutefois, il existe une grande hétérogénéité de ces maladies et de leurs évolutions qui peuvent être en partie expliquées par d'autres événements génétiques acquis ou germinaux.

Les mutations acquises associées aux NMP (Figure 2)

Un certain nombre de mutations impliquées dans l'épigénétique ou les composants de l'épissage ont été identifiées dans les NMP. Ces mutations ne sont pas spécifiques de ces maladies puisqu'elles sont aussi présentes dans d'autres hémopathies malignes (NMP/SMD, SMD, LAM) et ne sont pas responsables de la myéloprolifération, mais modifient plutôt le phénotype de ces maladies.

Les facteurs de régulation épigénétique

Des mutations du gène *TET2* ont été identifiées dans les NMP de façon assez fréquente allant de 4 à 11 % dans les TE, 15 %

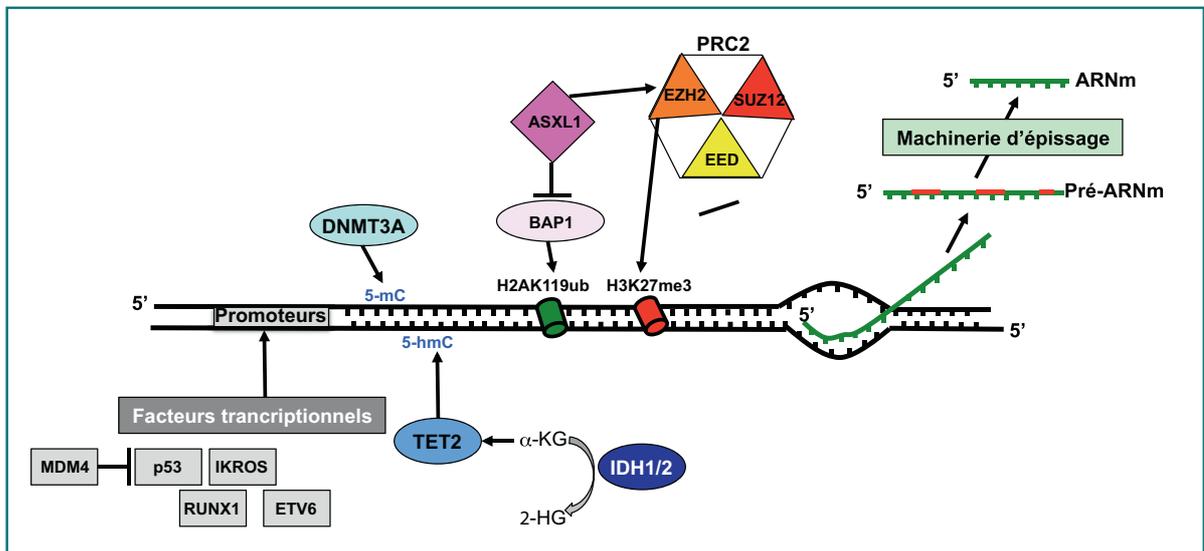


FIGURE 2

Mutations associées aux mutations de signalisation dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP).

Les mutations associées aux NMP affectent des composants de la machinerie d'épigénétique ou d'épissage. Lors de la transformation des NMP, des anomalies dans les facteurs de transcription apparaissent également. Parmi les molécules d'épigénétique mutées dans les NMP, on trouve *TET2*, *IDH1/2*, *DNMT3A*, *EZH2* et *ASXL1*. Un certain nombre d'anomalies dans les molécules de la machinerie d'épissage sont également trouvées incluant *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *PRPF40B* et *SF1*. Enfin, parmi les facteurs transcriptionnels, on trouve fréquemment des mutations de *P53* ou des amplifications de son régulateur négatif *MDM4*, des mutations de *RUNX1*, et plus rarement des délétions d'*IKZF1* ou *ETV6*.

dans les PV, 20 % dans les MFP et 26 % des leucémies post-NMP [14,42,43]. Les mutations de *TET2* sont perte-de-fonction et incluent des mutations faux-sens au niveau de région conservée ou de sites d'épissage, des mutations non-sens, des délétions ou des insertions résultant d'un décalage du cadre de lecture. Il a été décrit comme suppresseur de tumeur puisqu'il existe des mutations bi-alléliques. *TET2* appartient à une famille de trois membres incluant *TET1*, *TET2* et *TET3*. Les protéines correspondantes possèdent une fonction de 5-méthylcytosine dioxygénase dépendante de l' α -kétoglutarate (α -KG) et du fer, permettant la transformation de la 5-méthylcytosine (5mC) en 5-hydroxyméthylcytosine (5-hmC). Elles participent donc à la régulation de l'expression génique. Les mutations de *TET2* sont associées à un défaut d'activité catalytique et globalement, les patients *TET2* mutés présentent un niveau de 5-hmC plus faible que des donneurs sains [44]. Les études sur la fonction de *TET2* dans les systèmes hématopoïétiques humain et murin montrent que le défaut de *TET2* entraîne une amplification des progéniteurs et induit la différenciation monocyttaire aux dépens des différenciations granuleuse, lymphoïde et érythroïde [45]. En effet, les modèles *in vivo* murins déficients en *TET2* récapitulent la plupart des hémopathies incluant la LMMC dans de nombreux cas et sont caractérisés par une amplification du nombre de progéniteurs et des CSH avec de hauts potentiels d'auto-renouvellement et de capacité de repopulation à long-terme [45]. Ainsi, ces données montrent que le défaut de *TET2* pourrait favoriser le développement des NMP et d'autres hémopathies malignes en favorisant la dominance clonale au niveau d'une CSH mutée. Il faut aussi souligner que les mutations de *TET2* sont trouvées dans la population générale de sujets âgés et associées à une hématopoïèse clonale [46].

Ces mutations peuvent apparaître le plus souvent avant les mutations de signalisation comme *JAK2V617F*, mais également après. Elles apparaissent plutôt après les mutations de *CALR* [30]. L'ordre des mutations est important dans les NMP et pourrait avoir un impact sur le phénotype de la maladie. En effet, une étude a montré que l'acquisition d'une mutation de *TET2* avant *JAK2V617F* résultait en un phénotype de TE alors que lorsque *JAK2V617F* précédait la mutation de *TET2*, les patients développaient plus fréquemment une PV [47]. De plus, au cours de leur progression, les patients peuvent acquérir des mutations de *TET2* qui sont plutôt associées à un mauvais pronostic [30].

Les mutations de *DNMT3A* sont parmi les plus récurrentes avec celles de *TET2* dans les NMP. Les mutations de *DNMT3A* se retrouvent à 3 % dans les TE, 7 % dans les PV, 7-15 % dans les MFP et 14 % dans les leucémies post-NMP [5,30]. La mutation la plus récurrente permet le changement du résidu R882 de la protéine. Dans tous les cas, la mutation n'est retrouvée qu'à l'état hétérozygote, indiquant un effet d'haploinsuffisance. *DNMT3A* appartient à la famille des protéines méthyltransférases, responsable de l'ajout *de novo* d'un groupement méthyl aux cytosines des îlots CpG. Son rôle sur l'hématopoïèse semble très similaire à *TET2* puisque le modèle murin déficient en *Dnmt3a* présente une augmentation des CSH dans la moelle osseuse tout en diminuant leur potentiel de différenciation. Ceci était corrélé avec une sur-régulation des gènes de multipotence des CSH et

une sous-régulation des facteurs de différenciation, mettant en exergue le rôle de *DNMT3A* en tant que répresseur épigénétique de gènes spécifiques des CSH [48]. Comme pour les mutations de *TET2*, l'ordre d'apparition des mutations semble important. Les mutations d'*EZH2* (*Enhancer of Zeste Homolog*) sont aussi décrites dans de nombreuses pathologies myéloïdes et lymphoïdes malignes. Dans les NMP, elles sont surtout présentes dans les MFP (13 %) [5,30]. Les mutations d'*EZH2* sont de type perte-de-fonction incluant souvent des délétions. Ce sont des anomalies qui apparaissent généralement après les mutations de signalisation et qui sont de mauvais pronostic dans les MFP. Elles favoriseraient un phénotype mégacaryocytaire plutôt qu'érythroïde en association avec *JAK2V617F* entraînant des TE ou MFP. *EZH2* fait partie du complexe PRC2 (Polycomb Repressive Complex) qui catalyse la triméthylation de la Lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) avec *EZH1*, *SUZ12*, *EED* et *RBAP46/48*. Il s'agit d'un complexe protéique qui joue un rôle essentiel dans le développement, le destin cellulaire et la prolifération, et qui est connu comme un répresseur épigénétique global de la transcription. D'autre part, certaines délétions ou mutations somatiques recensées chez d'autres membres du complexe PRC2 (*SUZ12*, *JARID2*...) sont observées dans certaines PV ou d'autres NMP/SMD, démontrant ainsi que la fonction du complexe PRC2 peut être compromise par la mutation de différents gènes [49]. Les mutations d'*ASXL1* (*Additional Sex Comb Like 1*) ont été trouvées dans les hémopathies myéloïdes malignes notamment, dans de nombreux SMD et SMD/NMP (LMMC). Dans les NMP, elles sont très rares dans les TE et PV (< 8 %) et surtout présentes dans les MFP (13-26 %) où elles sont les plus fréquentes parmi les mutations des gènes impliqués dans l'épigénétique [50]. De plus, 22-38 % des patients atteints d'une leucémie post-MFP possèdent cette mutation, établissant un rôle de ce gène dans la transformation leucémique. Les mutations d'*ASXL1* sont donc corrélées à un très mauvais pronostic de survie et une évolution vers les leucémies [51]. Les souris *asxl1*^{-/-} présentent notamment un phénotype de SMD, ce qui peut laisser supposer que la perte d'*ASXL1* pourrait induire des phénotypes dysplasiques [52]. *ASXL1* est une protéine nucléaire présente dans les complexes Polycomb, qui est impliquée dans au moins deux processus de contrôle épigénétique de répression, en agissant sur *PRC1* et sur *PRC2*. En effet, d'une part, la perte d'*ASXL1* induit l'activation de la protéine *BAP1*, une E3 ubiquitine ligase de l'histone H2A, ayant pour conséquence une inhibition de *H2AK119Ub*. D'autre part, *ASXL1* se fixe à *EZH2* et la délétion d'*ASXL1* induit une perte de la marque *H3K27me3* générée par *PRC2*.

Le dépistage des mutations de *IDH1/2* dans deux cohortes indépendantes a révélé peu de mutations en phase chronique des NMP (0,8 % des TE, 1,9 % des PV et 4 % des MFP) [5,30]. En revanche ces mutations sont très enrichies en phase blastique des NMP (21 %) indiquant un très mauvais pronostic de survie et de progression vers les leucémies. Les mutations sont généralement faux-sens hétérozygotes et ont pour conséquence une substitution sur les résidus R132 pour *IDH1* et R140 et R172 pour *IDH2*. *IDH1* et *2* codent les enzymes isocitrate déhydrogénase 1 et 2 qui

participent à la catalyse de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate en α -KG et leur activité est nécessaire à la protection cellulaire contre le stress oxydatif. Les enzymes mutées *IDH1/2* ont une affinité réduite à l'isocitrate, mais possèdent une nouvelle activité catalytique consistant en la synthèse de 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir du α -KG. Ainsi la forte diminution de la quantité d' α -KG diminue l'activité enzymatique de TET2 et d'autres enzymes dépendant de ce cofacteur. En effet, il a été montré que les mutants *IDH2* altèrent l'activité catalytique de TET2 et sont mutuellement exclusifs dans les LAM. Comme la déplétion de TET2, celle d'*IDH1/2* altère la différenciation hématopoïétique et augmente le nombre de cellules progénitrices ou souches [53]. Enfin, il a été montré que 2-HG est un antagoniste de l' α -KG et qu'il intervient dans des altérations des histones et de la méthylation de l'ADN. Tous ces résultats suggèrent un mécanisme commun de leucémogénèse des mutations *IDH1/2* et *TET2*.

Les gènes de la machinerie de l'épissage

L'épissage de l'ARN est un processus fortement régulé faisant intervenir de petites protéines ribonucléiques (snRNP) et d'autres composants protéiques dans le but de transformer les pré-ARNm en des ARNm matures (élimination des introns). Chez les patients atteints de NMP des anomalies correspondant à des mutations de cette machinerie sont retrouvées dans 9,4% des cas, presque exclusivement des MFP [54].

SF3B1, un gène clé de l'épissage, est muté tout particulièrement dans les SMD, mais aussi dans 3 % des TE et dans 4 à 6,5 % des MFP. Néanmoins, les mutations de *SF3B1* ne semblent pas influencer la survie des patients et ne sont pas associées aux thromboses, mais à la présence de sidéroblastes en couronne posant le problème de la continuité entre TE et RARS-T.

Les mutations de ***SRSF2*** (*Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2*) sont retrouvées dans 17 % des MFP et dans 19 % des leucémies post-NMP. Elles sont significativement associées aux mutations d'*IDH* mais aussi de *TET2* (dans les LMMC), suggérant que *SRSF2* muté est aussi impliqué dans le phénomène de transformation leucémique des NMP. *SRSF2* possède un domaine RRM (*RNA Recognition Motif*) qui se fixe à l'ARN, et un domaine RS (riche en sérines) qui permet le recrutement des autres composants protéiques du complexe d'épissage.

D'autres gènes de cette machinerie tels que *U2AF1*, *ZRSR2*, *PRPF40B* et *SF1* sont retrouvés mutés dans moins de 2 % des NMP, mais les conséquences fonctionnelles de ces mutations dans ces pathologies restent encore obscures bien qu'il existe une corrélation entre la présence de mutations de *U2AF1* et l'importance des anémies dans les MFP.

Les autres molécules impliquées dans la transformation leucémique

TP53 code le suppresseur de tumeur P53, impliqué dans les mécanismes de réparation de l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la sénescence après dommage génomique et est fréquemment dérégulé dans de nombreux cancers. Les mutations de *P53* sont identifiées dans 5 à 10% des LAM *de novo*. Bien que présentes dans 3,1 % des phases chroniques des NMP, elles sont

fortement associées à la transformation des NMP en LAM (20 à 27 %) [55]. Ces mutations sont généralement homozygotes. De plus des amplifications du chromosome 1q ont été retrouvées dans 18 % des leucémies post-NMP alors qu'elles sont présentes dans 0,2 % des cas de NMP chroniques. La région minimale amplifiée sur ce chromosome comporte *MDM4*, un inhibiteur de l'activité transcriptionnelle de P53, souvent amplifié dans différents types de cancers. L'amplification de *MDM4* et les mutations de *P53* sont donc des événements mutuellement exclusifs, mettant en exergue un rôle important de cet axe dans la transformation des NMP en LAM. Le facteur de transcription ***RUNX1*** (AML1 ou encore CBFA2) ainsi que CBF β (*Core-Binding Factor Beta*), son partenaire hétérodimérique, compose le CBF (*Core Binding Factor*), est essentiel à l'hématopoïèse définitive. La dérégulation fonctionnelle de *RUNX1* est une des principales causes des leucémies. Certaines altérations génétiques acquises de *RUNX1* sont fréquemment retrouvées dans les LAM et les SMD. Les mutations de *RUNX1* sont rares dans les NMP, mais sont significativement associées à une progression des NMP en leucémies dans 27 à 37 % des cas [30].

IKZF1 code pour IKAROS, un facteur de transcription, impliqué dans le remodelage de la chromatine lors de la lymphopoïèse normale, ainsi que dans la myélopoïèse et l'activité des CSH. Les modèles murins déficients en *Ikaros* présentent de sévères défauts lymphoïdes entraînant des lymphomes ou des leucémies lymphoïdes. Dans une cohorte de patients atteints de NMP, les délétions d'*IKZF1* (délétion commune de del 7p) sont présentes dans moins de 1 % des NMP en phase chronique, et dans 20 % des patients atteints de leucémies post-NMP [56].

On trouve également de rares mutations d'***ETV6***, un gène membre de la famille des facteurs de transcription ETS. La partie N-terminale de cette protéine est impliquée dans les interactions protéine-protéine et la partie C-terminale permet la fixation à l'ADN. Les modèles murins KO suggèrent qu'*Etv6* est nécessaire à l'hématopoïèse normale et la maintenance du développement du réseau vasculaire. Ce gène est aussi connu pour être impliqué dans de nombreux réarrangements chromosomiques associés à des leucémies. *ETV6* interagit avec Grb2, FLI1 et HTATIP et peut former un gène de fusion avec ABL1 (gène *ETV6/ABL1*).

Autres facteurs participant à l'hétérogénéité des NMP

Des facteurs héréditaires pourraient également participer à l'initiation, au développement et à l'hétérogénéité des NMP. Des allèles de susceptibilité correspondant à des polymorphismes ou à des haplotypes contribuent au développement des NMP [57]. L'haplotype 46/1 ou GGCC favorise l'acquisition en *cis* de *JAK2V617F* et des mutations *MPLW515* avec une pénétrance faible. Cet haplotype correspondrait à un rtQTL (*replication timing quantitative trait loci*) qui favoriserait l'utilisation d'une origine de réplication particulière et créerait des interférences entre les machineries de réplication et de transcription, entraînant l'apparition de mutations de *JAK2* [58]. L'haplotype

46/1 n'a pas d'impact sur les mutations de *CALR* [59]. Une association entre un variant intronique de *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*), une transcriptase inverse appartenant au complexe de la télomérase, et les trois types de NMP (TE, PV et MFP) a été plus récemment mise en évidence [60]. Ce variant est également associé à des taux d'hémoglobine, de plaquettes et de leucocytes plus élevés chez les sujets sains, suggérant que son rôle s'exercerait au niveau d'un progéniteur myéloïde commun. TERT rs2736100 est retrouvé indifféremment en présence de *JAK2V617F* ou de mutations de *CALR*. Plus récemment, l'association entre plusieurs SNP et l'apparition de NMP a été rapportée : rs12339666 situé dans *JAK2* et rs2201862 en aval de *MECOM* qui s'associent plus fréquemment avec les NMP *JAK2V617F* négatifs, ainsi que rs9376092, localisé entre les gènes *HBS1L* et *MYB*, qui semble favoriser les TE *JAK2V617F* [61]. Ces variants sont fréquents dans la population générale, mais leur pénétrance faible et ils n'influencent que modérément le développement des NMP. Dans des familles de NMP, il a été récemment caractérisé des facteurs de prédisposition qui contribuent de façon importante au développement des NMP. Une découverte récente du groupe de R. Kralovics dans les familles développant des myélofibroses a récemment identifié *RBBP6* comme étant un gène de prédisposition [62]. Notre laboratoire a également identifié quatre familles de même origine géographique qui se distinguent des autres cas familiaux de NMP par leurs caractéristiques cliniques. Il s'agit de grandes familles de TE présentant une évolution très active de leur pathologie vers la MFP et la leucémie. Les analyses pan-génomiques ont mis en évidence une anomalie germinale qui consiste en une région de 700 kb dupliquée en tandem, présente chez tous les sujets atteints. Cette région contient 6 gènes (*TCL1A*, *BDKRB1*, *BDKRB2*, *ATG2B*, *GSKIP*, *AK7*) dont 2 (*ATG2B*, *GSKIP*) sont exprimés dans l'hématopoïèse myéloïde et sont impliqués dans le développement de ces maladies très évolutives [63].

Traitement des NMP

Plusieurs traitements sont utilisés dans les TE, PV, MFP afin de contrôler les complications thrombo-emboliques. Les antiagrégants plaquettaires sont préconisés ou bien des saignées itératives dans les cas de PV pour diminuer l'hématocrite. L'hydroxyurée (Hydrea®) est utilisée dans tous les cas de NMP à risque élevé de complications pour diminuer la prolifération cellulaire et donc la leucocytose, la thrombocytose, et la polyglobulie [64]. Ces traitements agissent donc sur les paramètres sanguins, mais n'ont pas apparemment d'effet sur la maladie elle-même ou sur les anomalies moléculaires. Le risque du traitement par l'Hydrea® d'augmenter la fréquence des leucémies à long terme est discuté alors que l'augmentation des leucémies par le pipobroman, le chloraminophène ou le Phosphore radioactif a été démontrée si bien que ces médicaments sont sortis de l'arsenal thérapeutique habituel des NMPs. L'anagrélide conserve des indications dans les TE avec des thrombocytoses importantes.

Etant donné que toutes ces maladies sont dues à l'activation de la voie JAK2/STAT, des inhibiteurs de JAK2 ont été plus récemment développés par de nombreuses compagnies pharmaceutiques. Ces inhibiteurs pharmacologiques de spécificité variable pour JAK2 et non sélectif de *JAK2V617F* ont été utilisés dans les MFP, puis dans les PV et les TE graves. Le ruxolitinib est le seul médicament à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché en Europe et aux USA [65]. Un certain nombre d'autres inhibiteurs ont été arrêtés pour toxicité neurologique et cardiaque comme le fédératinib ou le pacritinib. Le ruxolitinib réduit beaucoup les symptômes de la maladie dans les MFP, en particulier la taille de la rate et la cachexie et augmente la qualité de vie. Ces effets semblent être liés aux effets sur le syndrome inflammatoire associés aux NMP. Ce syndrome est la conséquence de la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules du clone et par des cellules n'appartenant pas aux clones à la fois hématopoïétiques comme les cellules du système immunitaire ou non hématopoïétiques. Ces cytokines comme par exemple l'IL-6 induisent un syndrome inflammatoire via les voies JAK1/JAK2/STAT3 si bien que l'inhibition simultanée de JAK1 et JAK2 par le ruxolitinib explique ces effets anti-inflammatoires [66]. Même s'ils affectent surtout les symptômes, ces inhibiteurs agissent aussi sur le clone muté, mais après de nombreuses années de traitement. Ce traitement a été aussi utilisé chez des patients atteints de PV résistants ou intolérants à l'hydroxyurée et montre une diminution de la splénomégalie dans 40 % des cas et une normalisation du taux d'hématocrite dans 60 % des cas. Il est possible que dans les PV, le ruxolitinib ait plus d'effets sur le clone *JAK2V617F* que dans la myélofibrose, ce qui pourrait être expliquée par le fait que la myélofibrose est un NMP plus complexe que les PV et TE et se rapproche pour certaines d'entre elles des SMD.

D'autres molécules, notamment des inhibiteurs de télomérase tel que l'imetelstat, dont les résultats préliminaires semblent prometteurs, des inhibiteurs d'histones déacétylases (HDAC) ou d'HSP90 (*Heat Shock protein 90*), sont actuellement en cours de développement, seuls ou en association, dans la MFP [64]. L'IFN α est utilisé dans les patients TE ou PV pour réduire la thrombocytose et l'hématocrite. Il est capable d'induire non seulement une réponse hématologique, mais également une réponse moléculaire et partielle ou complète sur le clone *JAK2V617F* et sur le clone *CALRm* dans à peu près 20-30% des cas [67]. Cependant, c'est un traitement à long terme, lourd et avec des effets secondaires parfois non négligeables, même si le développement de l'IFN α pégylé les a diminués. De plus, il existe un certain nombre de patients (20 %) qui restent résistants à ce traitement. Chez la souris knock-in *Jak2V617F*, l'IFN α récapitule la réponse hématologique et moléculaire en ciblant les CSH *Jak2V617F* ce qui signifie que potentiellement un traitement par l'IFN α pourrait guérir la maladie [16]. Le mécanisme de ce ciblage reste toutefois inconnu et doit à l'avenir être compris pour permettre de trouver des alternatives à ce traitement ou diminuer la durée du traitement ou encore trouver des alternatives aux résistances.

Conclusion

La grande majorité des NMP classiques ont été identifiés comme des maladies de la voie récepteur de cytokine/JAK2/STAT même si dans 10 % des cas l'anomalie motrice n'a pas encore été découverte. La TE et la PV sont les formes les moins évoluées et les plus simples sur le plan génétique contrairement à la MFP qui présente souvent un certain nombre d'anomalies associées comme les mutations de l'épigénétique ou d'épissage. Ces maladies évoluent à plus long terme vers des leucémies secondaires ce qui font des NMP un excellent modèle pour étudier le mécanisme de leucémogénèse à des temps précoces. Un bon nombre de questions se pose encore. En particulier, comment apparaissent ces maladies ? Comment se fait l'apparition des mutations motrices et comment s'amplifient-elles au niveau des CSH pour induire une maladie ? Pourquoi les différentes mutations motrices induisent des maladies différentes ? Comment se font les coopérations entre les différentes anomalies génétiques pour induire les leucémies ? Enfin, comment des traitements comme l'IFN α agissent pour éventuellement guérir les malades ?

Abréviations : NMP: néoplasme myéloprolifératif; TE: thrombocytémie essentielle; PV: polyglobulie de Vaquez, MFP: myélofibrose primaire; MF: myélofibrose; CSH: cellule souche hématopoïétique, LMMC: leucémies myélomonocytaire chronique, SMD: syndrome myelodysplasique; LAM: leucémie aiguë myéloïde; IL: interleukine; CALR: calreticulin; OMS: organisation mondiale de la santé; NGS: next-generation sequencing; IFN: interféron, MPL : récepteur à la thrombopoïétine, EPOR : récepteur à l'érythropoïétine, G-CSFR : récepteur au granulocyte colony stimulating factor, JAK : Janus activated kinase, HDAC histones déacétylases, ou d'HSP90 : Heat Shock protein 90

Remerciements : Ce travail est financé par la Ligue Nationale Contre le Cancer (« Equipe labellisée 2016 ») ; l'Association pour la Recherche sur le Cancer (projet libre 2012 à IP) ; l'Agence Nationale de la Recherche, programme Jeunes Chercheuses et Jeunes Chercheurs (ANR-13-JVSV1-GERMPN-01 à IP) ; l'Institut National du Cancer (PLBIO2015 à IP) ; le *MPN research foundation* ; et l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). Ce groupe appartient au laboratoire d'excellence du Globule Rouge (IP et WV) financé par le programme « Investissements d'avenir ». MM est financée par la Ligue Nationale Contre le Cancer et GV a obtenu un mandat d'aspirant-FNRS.

Déclaration d'intérêts : Les auteurs ne déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts avec cet article.

Références

- [1] Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.
- [2] Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123(10):1544-51.
- [3] Kiladjian JJ, Chevret S, Dosquet C, Chomienne C, Rain JD. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(29):3907-13.
- [4] Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine*. 2013;369(25):2379-90.
- [5] Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine*. 2013;369(25):2391-405.
- [6] Yamaoka K, Saharinen P, Pesu M, Holt VE, 3rd, Silvennoinen O, O'Shea JJ. The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol*. 2004;5(12):253.
- [7] Hammaren HM, Ungureanu D, Grisouard J, Skoda RC, Hubbard SR, Silvennoinen O. ATP binding to the pseudokinase domain of JAK2 is critical for pathogenic activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(15):4642-7.
- [8] Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. 2013;32(21):2601-13.
- [9] James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-8.
- [10] Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(8):754-9.
- [11] Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood*. 2012;119(15):3539-49.
- [12] Duek A, Lundberg P, Shimizu T, Grisouard J, Karow A, Kubovcakova L, et al. Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood*. 2014;123(25):3943-50.
- [13] Grisouard J, Shimizu T, Duek A, Kubovcakova L, Hao-Shen H, Dirnhofer S, et al. Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. *Blood*. 2015;125(13):2131-40.
- [14] Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652-60.
- [15] Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Loofer R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood*. 2008;111(8):3931-40.
- [16] Hasan S, Lacout C, Marty C, Cuingnet M, Solary E, Vainchenker W, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood*. 2013;122(8):1464-77.
- [17] Li J, Kent DG, Godfrey AL, Manning H, Nangalia J, Aziz A, et al. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood*. 2014;123(20):3139-51.
- [18] 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(7):2435-7.
- [19] Scott LM. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *American journal of hematology*. 2011;86(8):668-76.
- [20] Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood*. 2011;117(10):2813-6.
- [21] Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in mye-

- lofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS medicine*. 2006;3(7):e270.
- [22] Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-6.
- [23] Defour JP, Chachoua I, Pecquet C, Constantinescu SN. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2015.
- [24] Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004;103(11):4198-200.
- [25] Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127(3):333-42.
- [26] Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(3):325-32.
- [27] Vannucchi AM, Antonioni E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Guerini V, Barosi G, et al. Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood*. 2008;112(3):844-7.
- [28] Guglielmelli P, Pancrazzi A, Bergamaschi G, Rosti V, Villani L, Antonioni E, et al. Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *British journal of haematology*. 2007;137(3):244-7.
- [29] Broseus J, Park JH, Carillo S, Hermouet S, Girodon F. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood*. 2014;124(26):3964-6.
- [30] Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220-8.
- [31] Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249-52.
- [32] 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*. 2016;127(10):1317-24.
- [33] Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2009;417(3):651-66.
- [34] Balligand T, Achouri Y, Pecquet C, Chachoua I, Nivarthi H, Marty C, et al. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia*. 2016.
- [35] Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325-35.
- [36] 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*. 2016;127(10):1307-16.
- [37] Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*. 2014;28(7):1568-70.
- [38] Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010;116(6):988-92.
- [39] Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *The New England journal of medicine*. 2010;363(12):1189-90.
- [40] Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, Furlonger C, Vesely S, Bernstein A, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med*. 2002;195(12):1599-611.
- [41] Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014;123(22):e123-33.
- [42] Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England journal of medicine*. 2009;360(22):2289-301.
- [43] Mahfoudhi E, Secardin L, Scourciz L, Bernard O, Vainchenker W, Plo I. [Properties and biological roles of TET proteins during embryogenesis and in hematopoiesis]. *Medecine sciences : M/S*. 2015;31(3):268-74.
- [44] Pronier E, Almire C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, da Costa Reis Monte Mor B, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulocyte-monocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2011.
- [45] Quivoron C, Couronne L, Della Valle V, Lopez CK, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. *Cancer cell*. 2011;20(1):25-38.
- [46] Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012;44(11):1179-81.
- [47] Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine*. 2015;372(7):601-12.
- [48] Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2012;44(1):23-31.
- [49] Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D, et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2012;119(5):1208-13.
- [50] Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carubbia N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British journal of haematology*. 2009;145(6):788-800.
- [51] Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-9.
- [52] Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, Dey A, Trimarchi T, Chung YR, et al. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med*. 2013;210(12):2641-59.
- [53] Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*. 2010;18(6):553-67.
- [54] Yoshida K, Sanada M, Shiraiishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-9.
- [55] Harutyunyan A, Klampff T, Cazzola M, Kralovics R. p53 lesions in leukemic transformation. *The New England journal of medicine*. 2011;364(5):488-90.
- [56] Klampff T, Harutyunyan A, Berg T, Gisslinger B, Schalling M, Bagienski K, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*. 2011;118(1):167-76.
- [57] Olcaydu D, Harutyunyan A, Jager R, Berg T, Gisslinger B, Pabinger I, et al. A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet*. 2009;41(4):450-4.
- [58] Koren A, Handsaker RE, Kamitaki N, Karlic R, Ghosh S, Polak P, et al. Genetic variation in human DNA replication timing. *Cell*. 2014;159(5):1015-26.
- [59] Soler G, Bernal-Vicente A, Anton AI, Torregrosa JM, Caparros-Perez E, Sanchez-Serrano I, et al. The JAK2 46/1 haplotype does not predispose to CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol*. 2015;94(5):789-94.
- [60] Hinds DA, Barnholt KE, Zehnder JL, Kiefer AK, Do CB, Eriksson N, et al. A germline variant in the TERT gene is a novel predis-

- position allele associated with myeloproliferative neoplasms 2012;54nd Annual Meeting of the American-Society-of-Hematology (ASH), Atlanta(Myeloproliferative Syndromes – Basic Science: Signaling & Genetics).
- [61] Tapper W, Jones AV, Kralovics R, Harutyunyan AS, Zoi K, Leung W, et al. Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun.* 2015;6:6691.
- [62] Harutyunyan AS, Giambruno R, Krendl C, Stukalov A, Klampfl T, Berg T, et al. Germline RBBP6 mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127(3):362-5.
- [63] Saliba J, Saint-Martin C, Di Stefano A, Lenglet G, Marty C, Keren B, et al. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. *Nat Genet.* 2015;47(10):1131-40.
- [64] Pasquier F, Cabagnols X, Secardin L, Plo I, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2014;14 Suppl:S23-35.
- [65] Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *The New England journal of medicine.* 2012;366(9):787-98.
- [66] Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2011;29(10):1356-63.
- [67] Verger E, Cassinat B, Chauveau A, Dosquet C, Giraudier S, Schlageter MH, et al. Clinical and molecular response to interferon-alpha therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood.* 2015;126(24):2585-91.

Objectifs

Afin d'appréhender les effets de l'IFN α sur le clone malin, deux types d'études ont été menés en parallèle au laboratoire : l'une utilise un modèle murin $JAK2^{V617F}$ et l'autre, des cellules primaires de patients traités à l'IFN α . En effet, nous avons développé un modèle de souris knock-in (KI) $JAK2^{V617F}$ conditionnel qui mime le phénotype de PV humaine. Par le biais de souris chimériques, il a ainsi été montré que l'IFN α induisait à la fois une réponse hématologique mais aussi moléculaire au niveau des CSH³²⁴. Il s'agit donc d'un outil préclinique efficace dans l'investigation du mécanisme d'action de la cytokine. D'autre part, en collaboration avec les Prs. J.J. Kiladjian et B. Cassinat (Hôpital Saint Louis, Paris), nous avons montré que, dans le sang périphérique de patients, les clones $JAK2^{V617F}$ homozygotes étaient ciblés plus rapidement que les clones $JAK2^{V617F}$ hétérozygotes et que les patients qui ne répondaient pas moléculairement au traitement –lorsque la charge allélique de $JAK2^{V617F}$ ne diminue pas au cours du traitement- présentaient uniquement des clones hétérozygotes $JAK2^{V617F}$ au début du traitement³⁵⁶.

Dans l'ensemble, ces résultats préliminaires suggèrent que l'IFN α cible spécifiquement les CSH $JAK2^{V617F}$ chez la souris et que chez l'Homme l'efficacité du traitement est corrélée à la présence de $JAK2^{V617F}$.

Ainsi, l'objectif général de mon travail a été de comprendre le mécanisme d'action de l'IFN α en utilisant différentes approches expérimentales. Deux sous-objectifs spécifiques ont alors été fixés :

- 1- Etude de l'effet de l'IFN α sur les différents compartiments hématopoïétiques de patients traités *in vivo* et atteints de NMP $JAK2^{V617F}$, $CALR^{mut}$ ou MPL^{mut} .
- 2- Etude des interrelations entre la signalisation induite par JAK2 et celle de l'IFN α dans les cellules primaires de patients et dans les lignées murines.

Ces objectifs ont été investigués sur une cohorte observationnelle de patients traités par l'IFN α , des cellules primaires de patients, des modèles de souris KI conditionnels $JAK2^{V617F}$ développés par notre groupe et des lignées cellulaires murines surexprimant $JAK2^{V617F}$ ou $CALR^{del52}$ humains.

Résultats

Partie 1. Etude de l'effet de l'IFN α sur les différents compartiments hématopoïétiques de patients traités *in vivo* et atteints de NMP $JAK2^{V617F}$ $CALR^{mut}$ ou MPL^{mut}

Les NMP classiques négatifs pour *BCR-ABL* (la TE, la PV et la MFP) sont des maladies clonales de la CSH, qui induisent une hyperprolifération d'un ou plusieurs lignages myéloïdes. Ces hémopathies sont causées par la présence de 3 mutations récurrentes, dites motrices, qui affectent la voie de signalisation JAK/STAT : $JAK2^{V617F}$, les mutations de la *CALR*, et de *MPL*. L'IFN α est le seul traitement curatif qui induit à la fois une réponse hématologique et moléculaire aussi bien dans les cellules $JAK2^{V617F}$ que celles mutées *CALR*. Dans l'étude qui suit, nous voulions comprendre comment et avec quelle cinétique l'IFN α agit sur les différents compartiments hématopoïétiques mutés. Ainsi, nous avons réalisé une étude prospective sur une cohorte de 47 patients (42% TE, 47% PV, 11% MF) traités à l'IFN α pendant 3 à 5 ans. Cette cohorte contient 33 patients $JAK2^{V617F}$, 11 patients mutés *CALR* (7 mutés *CALR* type 1, 4 mutés *CALR* type 2), 1 patient muté MPL^{W515K} et 2 patients mutés à la fois $JAK2^{V617F}$ et *CALR*. Tous les 4 mois, la fréquence allélique des mutations $JAK2^{V617F}$ et *CALR* a été mesurée dans les cellules matures (granulocytes, plaquettes). En parallèle, l'architecture clonale a été réalisée en étudiant la présence de ces mutations dans les colonies dérivées de différentes populations de progéniteurs plus ou moins enrichies en cellules souches. Après un suivi médian de 33 mois, on constate que l'IFN α cible plus rapidement et plus efficacement les populations progénitrices que les populations sanguines matures dans les patients $JAK2^{V617F}$ ($p < .05$). De plus, les clones homozygotes $JAK2^{V617F}$ répondent plus rapidement que les clones hétérozygotes dans tous les compartiments hématopoïétiques, témoignant de la corrélation entre l'efficacité de l'IFN α et la présence de $JAK2^{V617F}$. Ces résultats sont maintenus et légèrement renforcés après un suivi médian de 51 mois. Toutefois, sur un suivi médian de 33 mois des patients mutés *CALR*, l'IFN α agit de manière similaire sur les populations progénitrices et matures, et la réponse à l'IFN α est plus faible dans les compartiments progéniteurs mutés *CALR* que dans ceux mutés $JAK2^{V617F}$ ($< .05$). Le

rôle des mutations associées au diagnostic a aussi été investigué dans les populations progénitrices de patients répondeurs moléculaires à l'aide d'un panel NGS ciblant des gènes de pathologies myéloïdes. Chez les patients $JAK2^{V617F}$, le nombre et la nature des mutations associées ne semblent pas influencer les réponses moléculaires dans les populations progénitrices et matures. Toutefois, dans la cohorte de patients *CALR*, bien que restreinte, les répondeurs moléculaires ne sont pas associés à d'autres mutations. Par le biais de lignées murines Ba/F3-MPL et des cellules primaires de patients, nous avons montré que $JAK2^{V617F}$ améliore la sensibilité à l'IFN α en augmentant à la fois l'expression et la phosphorylation de STAT1 ainsi que l'expression de gènes cibles (ISGs) de l'IFN α , comparativement aux contrôles et aux lignées mutées *CALR*.

Au final, nos résultats montrent que l'IFN α cible différenciellement les populations progénitrices et matures mutées $JAK2^{V617F}$ et *CALR*. De plus, la réponse moléculaire semble dépendre à la fois du statut mutationnel et des autres mutations associées, seulement dans le cas des patients mutés *CALR*.

Article en cours de soumission

Differential impact of interferon-alpha on *JAK2*^{V617F}-mutated and *CALR*-mutated stem and progenitor cells in classical MPN

Running title: IFN-alpha targets *JAK2*^{V617F}-mutated faster than *CALR*-mutated progenitors

Matthieu Mosca^{1,2,3}, Robert Noble^{9,10}, Christophe Marzac, Lamia Lamrani^{1,2,3}, Amandine Tisserand^{1,2,3}, Valérie Edmond^{1,2,3}, Mira Elkhoury^{1,2,3,4}, Caroline Marty^{1,2,3}, Eric Solary^{1,2}, Nicole Casadevall^{1,7}, Bruno Cassinat, Jean-Jacques Kiladjian, Stefan N. Constantinescu⁵, Hana Raslova^{1,2}, Michael E Hochberg^{10,11}, Francois Girodon, Jean-luc Villeval, William Vainchenker^{1,2,4}, Isabelle Plo^{1,2,4}

1- Gustave Roussy, INSERM, UMR 1170, Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Villejuif, France

2- Gustave Roussy, Université Paris-Sud, UMR 1170, Villejuif, France

3- Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France

5- Ludwig Institute for Cancer Research, and Université Catholique de Louvain, de Duve Institute, Brussels, Belgium

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

8- Département de Génétique, Hôpital Universitaire Pitié- Salpêtrière, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Paris, France

9- Department of Biosciences and Engineering, ETH Zurich, Basel, Switzerland

10- Institut des Sciences de l'Evolution, University of Montpellier, Montpellier, France

11- Santa Fe Institute, Santa Fe, NM 87501, USA

Corresponding authors: Isabelle Plo UMR U1170, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, isabelle.plo@gustaveroussy.fr; Phone: +33 (0)1 42 11 42 33. Fax: +33 (0)1 42 11 52 40.

Keywords : IFN α , classical MPN, progenitors, JAK2V617F, CALR

Abstract :

Classical BCR-ABL-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) including Polycythemia Vera (PV), Essential Thrombocytemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF) are acquired clonal disorders of hematopoietic stem cells (HSC), which lead to hyperplasia of one or several myeloid lineages. MPN are caused by three main recurrent mutations affecting the JAK/STAT signaling pathway: JAK2^{V617F} and mutations in calreticulin (CALR) and thrombopoietin receptor (MPL). Interferon alpha (IFN α) is the only curative treatment that induces not only a hematological but also a molecular response of ET, PV and early MF. In this study, we investigated how and with what kinetics IFN α impacts the different mutated hematopoietic compartments. Thus, we have performed a prospective study with a cohort of 47 patients (42% ET, 47% PV, 11% MF) treated with IFN α for 3-5 years. This cohort included 33 JAK2^{V617F}-mutated patients, 11 CALR-mutated patients (7 type 1/type 1-like and 4 type 2/type 2-like), 2 both JAK2^{V617F}- and CALR-mutated patients and 1 MPLW515K-mutated patient. At 4-month intervals, the JAK2^{V617F} or/and CALR mutation variant allele frequency was measured in mature cells (granulocytes, platelets). Simultaneously, we have also determined the clonal architecture by studying the presence of JAK2^{V617F}, CALR and MPL mutations in colonies derived from different hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) populations. After a median follow-up of 33 months, we observed that IFN α targets HSPC (particularly HSC-enriched progenitors) faster and more efficiently than mature blood cells in JAK2^{V617F} patients. Moreover, homozygous JAK2^{V617F} clones responded faster than heterozygous clones in all hematopoietic cell compartments, suggesting that the efficacy of IFN α correlates with the presence of JAK2^{V617F}. These rates were slightly increased after a median follow-up of 51 months. In contrast, in CALR-mutated patients with a median follow-up of 33

months, IFN α affected HSPC and mature cells similarly, and the response to IFN α was slower in *CALR*-mutated than in *JAK2*^{V617F}-mutated HSPC. The role of associated mutations at diagnosis was also investigated in the IFN α -mediated HSPC molecular responses using an NGS targeted myeloid panel. In *JAK2*^{V617F}-mutated patients, the number of associated mutations did not impact the HSPC molecular response of the *JAK2*^{V617F} clone. However, in the *CALR*-mutated patients, the only molecular responders were those not associated with other mutations. Using Ba/F3-MPL cellular models and primary cells, we observed that cells expressing *JAK2*^{V617F} were more sensitive to IFN α than controls or *CALR*del52 mutated cells. Altogether, our results show that IFN α differentially targets the human *JAK2*^{V617F}- and *CALR*-mutated HSPC and mature cells. Moreover, the molecular response was dependent not only on the *JAK2*^{V617F} or *CALR* mutated status but was influenced by the presence of associated mutations.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are a group of clonal hematological malignancies characterized by increased proliferation of erythroid, megakaryocytic or granulocytic lineages, leading to an abnormally high number of mature blood cells. We will focus here on the Philadelphia chromosome-negative MPN, including polycythemia vera (PV), essential thrombocytemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). PV results in overproduction of red blood cells and eventually myeloid cells, ET in overproduction of platelets and PMF in overproduction of myeloid cells associated with excessive production of fibrotic tissue in the bone marrow. Together, they represent the most prevalent myeloid hematological malignancies (0.3-0.5/1,000 in Europe)(Moulard et al., 2014). These diseases can progress from one to another and particularly to myelofibrosis, which is a more severe disease.

Besides thrombo-hemorrhagic complications, the most dramatic comorbidity is disease progression to secondary acute myeloid leukemia.

MPN are due to acquisition of gain-of-function mutations in molecules affecting the JAK2/STAT pathway at the level of hematopoietic stem cells (HSC). The most prevalent mutation in the three diseases is JAK2^{V617F} (James et al., 2005). Calreticulin (CALR) and activating MPL^{W515X} mutations are also observed, but only in ET and PMF (Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013; Pikman et al., 2006). They are considered as “driver” mutations since they recapitulate the ET-like or PV-like disease development and progression to myelofibrosis as demonstrated by several mouse models (Hasan et al., 2013; Marty et al., 2016; Tiedt et al., 2009). In addition to these driver mutations, a number of other somatic mutations commonly mutated in hematological malignancies have been identified in 5-30% of patients with MPN, especially in PMF. These additional mutations affect genes involved in epigenetic regulation (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH2*), splicing (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*) or transcription factors (*P53*, *RUNX1*, *ETV6*, *IKZF*) (Vainchenker et al., 2011). They are not responsible for the myeloproliferation, but can modify the phenotype of the disease (myelofibrosis progression, myelodysplastic features, leukemic transformation) (Vainchenker and Kralovics, 2017).

ET and PV are generally treated to control the disease and avoid the thrombo-hemorrhagic complications using anti-aggregant, phlebotomy or cytoreductive therapy, such as hydroxycarbamide in high-risk patients. JAK inhibitors such as ruxolitinib greatly improve symptoms and quality of life in MF and some PV, but have limited effect on the disease itself. Among novel therapeutic approaches being developed, Peg-IFN α 2a has mainly been used in ET, PV and in some early MF. Clinical trials have shown high rates of hematological responses and more interestingly some molecular responses in JAK2^{V617F} PV/ET reaching complete

molecular response (CMR) in 20% of cases (Kiladjian et al., 2008; Kjaer et al., 2016; Masarova et al., 2017; Quintas-Cardama et al., 2013; Silver, 1988). Later studies have shown that Peg-IFN α 2a also induces a hematological response in *CALR*-mutated ET with molecular responses but eventually with different kinetics than the *JAK2V617F*-mutated MPN (Kjaer et al., 2016; Verger et al., 2015). These studies have also emphasized that associated mutations can impact the molecular response – particularly the number of mutations and the type of the mutations such as *TET2* (Kiladjian et al., 2010; Quintas-Cardama et al., 2013; Verger et al., 2015).

In mice, two groups have shown that IFN α targets hematopoietic stem cells (HSC) (Hasan et al., 2013; Mullally et al., 2013). In human primary samples, other studies have shown that IFN α can target more specifically *JAK2V617F*-positive erythroid progenitors *in vitro* (Lu et al., 2010b). However, the kinetics of targeting remains poorly understood, and no study has concomitantly investigated the impact of IFN α on hematopoietic stem and progenitor cells as well as on mature cells in *JAK2V617F* or *CALR* mutated patients. Therefore, the present study aims to evaluate how IFN α treatment of MPN patients affects various hematological compartments, including the HSC-enriched progenitors, to enable us to predict the response and avoid the treatment of patients that will never respond.

Material and Methods

Materials

Human recombinant Interleukin-3 (IL-3), fetal liver tyrosine kinase 3 (FLT3-L) and erythropoietin (EPO) were generous gifts from Amgen (Neuilly, France). TPO was generous gift from Kirin (Tokyo, Japan). Stem Cell Factor (SCF) was purchased from Biovitrum AB (Stockholm). IL-6, GCSF and murine IFN α were from Miltenyi Biotech (France). BMS911543

compound was a gift from BMS. Ruxolitinib was purchased from Euromedex (France). Human IFN α was from Millipore.

Patients, cell purification and erythroblast cultures

Peripheral blood samples and bone marrow were collected from patients. Written informed consent was obtained from patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved by the Ethics Committee from CHU DIJON, Saint Louis Hospital and Gustave Roussy; from Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France IV- Institutional review board (agreement from US Department of Health and Human Services (n°IRB 00003835- Protocol 2015/59-NICB) and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) (authorization #915663).

Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 180 x g for 15 min at 20°C, was resuspended and centrifuged at 1,500 x g for 15 min at 20°C. Platelet pellet was carefully resuspended in PBS with 0.1% EDTA. Mononuclear cells and granulocytes were then separated over a Ficoll density gradient. Granulocytes were obtained after lysing the red cells and CD34⁺ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS; Miltenyi Biotec). CD34⁺ cells were sorted on CD90, CD34 and CD38 antibodies (Becton Dickinson) on a BD Influx cell sorter and the following fractions CD90⁺CD34⁺CD38⁻, CD90⁻CD34⁺CD38⁻ and CD90⁻CD34⁺CD38⁺ were cloned at 1 cell /well and cultured in serum-free medium (Iscove Modified Dulbecco Medium with penicillin/streptomycin/glutamine, alpha-thioglycerol, Bovine Serum Albumin (BSA), a mixture of sonicated lipids and insulin-transferrin and in presence of a cocktail of human recombinant cytokines containing EPO (1 U/mL), TPO (20 ng/mL), SCF (25 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL), FLT3-L (10 ng/mL), G-CSF (20 ng/mL), IL-6 (100 U/mL). Fourteen days later, individual colonies were plucked and lysed.

Inclusion and response criteria

The observational study had a prospective longitudinal design and included 47 patients. The criteria were: ET, PV or MF diagnosed according to WHO criteria; presence of an MPLW515X, JAK2V617F or CALR mutation; and treatment with peg-IFN α for at least three months and up to 51 months with sequential blood samples including before peg-IFN α therapy. Prior treatment with other cytoreductive drugs was not grounds for exclusion. The prescribed IFN formulation was subcutaneous injections of pegylated IFN -2a (Pegasys®).

Hematological response was assessed according to the European LeukemiaNet (ELN) criteria for ET and PV (Barosi et al., 2009). For PMF, we defined a sustained complete hematological response.

For evaluation of molecular response, we defined it as the difference between the mutation allele burden in each HSPC population or in granulocytes at the initiation of IFN α treatment and the mutant allele burden measurement in each corresponding population either at 33 months or 51 months. We used the following previously described definitions (Kiladjian et al., 2006; Verger et al., 2015): complete molecular response (CMR) when mutation was reduced to undetectable levels, partial molecular response (PMR) when the mutant allele burden decrease was >50% and minor molecular response (mMR) when a 25-49% reduction in the mutant level was observed.

Next-generation targeted sequencing

A panel of 77 genes designed for the diagnosis of myeloid malignancies was designed (confere supplemental methods) . Libraries were obtained from 200 ng of genomic DNA using HaloPlex Target Enrichment System (Agilent technologies) and sequencing was performed using a MiSeq sequencer (Illumina), according to the manufacturer's protocols.

Results were analysed after alignment of the reads using two dedicated pipelines, SOPHiA DDM[®] (Sophia Genetics) and an in-house software GRIO-Dx[®]. For all samples, an average depth exceeding 200X for > 90% of the target regions was required. All pathogenic variants were manually checked using Integrative Genomics Viewer software.

Nucleic acid extraction, genotyping and fragment analysis

Total RNA from platelets was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen) and cDNA was synthesized by SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Genotyping was performed by Taqman allelic discrimination for *JAK2V617F* on the ABI Prism GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Invitrogen). Genomic DNA from granulocytes was isolated using DNA QiaAmp Kit (Qiagen) and genotyping was performed as previously described by Taqman allelic discrimination for *MPLW515K* and *JAK2V617F* (Chaligne et al., 2007; James et al., 2005) or by fragment sizing using the BigDye Terminator chemistry (Life Technologies) on a Genetic Analyser for *CALR* mutations. Colonies corresponding to the progeny of each progenitor were lysed with proteinase K and 0.2% Tween 20 (Sigma) at 65° for 60 minutes and 95°C for 15 minutes. DNA from cells or colonies was genotyped with two techniques: a conventional PCR amplification using primers CALR_FWD (ACAACCTTCCTCATCACCAACG) and CALR_Rev (GGCCTCAGTCCAGCCCTG) or CALR-Ex9-FWD (TGGTCCTGGTCCTGATGTCTG) and CALR-Ex9-REV (CTCTACAGCTCGTCCTTG) and a quantitative PCR amplification using specific primers for type 1 and type 2 as previously described (Kjaer et al., 2016).

Cell lines

The murine pro-B Ba/F3 were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS (Stem Cell Technologies) and 5% WEHI-conditioned medium as a source of murine IL-3. Ba/F3 cells were transduced with pMX-IRES-CD4 retrovirus to stably express the human wild-type MPL, carrying a N-terminal Flag-tag and with pMX-IRES-GFP JAK2WT, JAK2V617F, CALRWT, CALRdel52 or CALRins5. Ba/F3-MPL-JAK2/CALR CD4⁺/GFP⁺ cells were subsequently sorted by flow cytometry (Influx, Beckman-Coulter).

Western blot analysis

Signaling studies were performed using polyclonal antibodies against the phosphorylated forms or the total JAK2 (Tyr 1007/1008), STAT5 (Tyr 694), STAT1, STAT3, ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204) and Akt (Ser 473) and against the pan proteins (Cell Signaling Technology, Ozyme). β -actin (Sigma) was used as loading control.

RESULTS

Study of MPN prospective cohort treated with IFN α

We followed 47 MPN patients that were treated with IFN α in a longitudinal observational study and analyzed their blood samples before and during the IFN α treatment (**Supplemental Table 1**). The MPN disease distribution was 42% ET, 47% PV and 11% MF. We detected 33 patients with $JAK2^{V617F}$ mutation, 11 with $CALR$ -mutated (7 type 1/type 1-like and 4 type 2/type 2-like), 1 with MPL^{W515K} , and 2 with both $JAK2^{V617F}$ and $CALR$ mutations. The gender was balanced (23F/24M) and the median age at diagnosis was 52 years old [range 26-78] for the $JAK2^{V617F}$ patients and 54 years old [range 44-70] for $CALR$ -mutated patients. The median time of IFN α treatment was 51 months [range 6-135] for $JAK2V617F$

patients and 33 months [range 4-59] for *CALR*-mutated patients. So far, we observed intolerance due to side effects in 17% and 23% in *JAK2*^{V617F} and *CALR*-mutated patients, respectively, in which the treatment was stopped. After a 33-month median time of IFN α treatment, around 8% of *JAK2*^{V617F}- and *CALR*-mutated patients hematological were non-responders (**Figure 1 A and B**). These result show that IFN α induces a strong hematological response, comparable in both *CALR* mutated and *JAK2*^{V617F} patients in our cohort.

IFN α acts more efficiently on *JAK2*^{V617F}-mutated than on *CALR*-mutated HSPC

We next investigated how IFN α impacts the molecular response of the *JAK2*^{V617F}, *CALR*- and *MPL*-mutated patients at different stages of hematopoiesis and particularly at the level of HSPC. To that purpose, we took peripheral blood at least 2-3 times a year from all the IFN α tolerant patients. We purified not only mature cells (granulocytes and/or platelets) but also different types of progenitors: CD90⁺CD34⁺CD38⁻ HSC-enriched progenitors, CD90⁻CD34⁺CD38⁻ immature progenitors and CD90⁻CD34⁺CD38⁺ committed progenitors. At each time point, the variant allele frequency was analyzed in global granulocytes. Moreover, the clonal architecture of the mutated HSPC was examined by genotyping the progeny of one progenitor/well (20-180 colonies) and the global allele frequency of HSPC was also calculated.

After a follow-up of 33 months of 25 *JAK2*^{V617F}-mutated patients, we found a molecular response of 40% with 8% of complete molecular response (CMR), 16% of partial molecular response PMR and 16% of minor molecular response (mMR) in granulocytes. The granulocyte molecular response was lower in ET (2/7; 28%) than in PV (7/16; 44%). We found much higher global molecular response in the HSPC with 71% in committed progenitors, 81% of in immature progenitors and 86% in HSC-enriched progenitors with CMR

of 38% in the most immature progenitors (4.8 times more than in granulocytes; $p < 0.05$) (**Figure 2A, B, C, D**). After a follow-up of 51 months of the $JAK2^{V617F}$ -mutated patients, we found that the gap between the molecular responses of granulocytes and progenitors was smaller than at 33 months of follow-up but was still more prominent in HSPC: 12% CMR, 24% PMR and 20% mMR in the granulocytes versus 43% CMR, 29% PMR and 14% mMR in HSC-enriched progenitors (**Supplemental Figure 1 A, B, C, D**).

We also investigated how $IFN\alpha$ influences the molecular response of $CALR$ -mutated patients at different stages of hematopoiesis. After 33 months follow-up of 12 $CALR$ -mutated patients, we found a molecular response of 24%, with 8% CMR, PMR and mMR in granulocytes, and very similar results in the HSPC compartment (**Figure 3 A,B,C,D**). Very interestingly after the same follow-up, the HSPC molecular responses of $CALR$ -mutated patients were substantially lower than those of $JAK2^{V617F}$ patients (27% vs 86%; $p < 0.05$) (**Figure 2 and 3**). Finally, the only MPL -mutated patients reached a PMR after a follow up of 33 months.

We also studied the $IFN\alpha$ efficacy during the follow-up and examples of patients with both hematological and molecular responses are presented in **supplemental Figure 2**. Of note, the $JAK2^{V617F}$ allele burdens were quite comparable between platelets and granulocytes and between bone marrow and peripheral blood HSPC. The linear regression analyses of the variant allele frequency were calculated in each compartment for all the patients studied. The slopes indicate that $IFN\alpha$ targets $JAK2^{V617F}$ HSPC faster than mature PNN overtime and that $IFN\alpha$ targets less efficiently the $CALR$ -mutated cells than the $JAK2^{V617F}$ cells (**Figure 4 A, B, C**). The clonal architecture of the heterozygous, homozygous clones and wild-type clones were also investigated for each patient and are represented in **Supplement Figure S3 and S4**. The analysis of trajectories of homozygous and heterozygous cells indicate the direction

indicating that homozygous cells decreased first followed by heterozygous cells, the latter being targeted more slowly in $JAK2^{V617F}$ ET and PV patients and in *CALR*-mutated ET and MF when they responded (**Figure 5 and supplemental Figure S5**).

Altogether these results show that: i) IFN α targets the HSPC compartment more efficiently in $JAK2^{V617F}$ patients than in *CALR*-mutated patients, ii) IFN α targets faster the $JAK2^{V617F}$ HSPC than mature cells (granulocytes, platelets), iii) IFN α efficacy is linked to the $JAK2^{V617F}$ homozygous status.

Effect of associated mutations on IFN α -induced molecular responses in HSPC.

In order to understand the effect of associated mutations on HSPC molecular response, we carried out next-generation sequencing on a targeted myeloid panel of 23 genes. As expected, we observed epigenetic factor mutations (TET2: 13.5%; SUZ12: 2.5%), splicing factor mutations (SF3B1: 2.5%; PRPF40B: 2.5%), transcriptional factor mutations (TP53: 11.3%; NFE2: 2.5%) and other signaling mutations (CSF3R: 4.5%; SH2B3: 2.5%; NRAS: 2.5%; CBL: 2.5%, PTPN11: 2.5%) (**Supplemental Tables 2 and 3**). We then evaluated the role of associated mutations on IFN α efficacy on the molecular response. While in $JAK2^{V617F}$ -mutated patients the number of associated mutations did not affect the HSPC or granulocytes molecular responses, in the (relatively few) *CALR*-mutated patients the only molecular responders were those who lacked other mutations either in granulocytes or progenitors (**Figure 6A, B, C and D**).

Effect of $JAK2^{V617F}$ and $CALR^{del52}$ on signaling induced by IFN α in cell lines.

To study whether $JAK2^{V617F}$ or $CALR^{del52}$ affects IFN α -mediated efficacy in patients, we measured the IFN α signaling of the Ba/F3-MPL cell lines overexpressing

JAK2^{WT}/JAK2^{V617F}/CALR^{WT}/CALR^{del52}. As shown in **figure 7A and B**, only JAK2^{V617F} -and not CALR^{del52}- expressing cells presented an increase in STAT1 protein. Moreover, JAK2^{V617F} expressing cells induced an IFN α sensitization on STAT1 phosphorylation at low doses and reaching a maximum activation earlier compared to JAK2^{WT}, CALR^{WT} and CALR^{del52} expressing cells. We also observed similar sensitization with JAK2^{V617F} and not CALR^{del52} expressing cells on two ISGs at low doses of IFN α : ISG15 and USP18 (**Figure 7C and D**).

DISCUSSION

Using a longitudinal cohort of patients treated for a median time of 33 months with IFN α treatment, we analyzed precisely the hematological and molecular responses in ET/PV/MF with JAK2V617F, CALR or MPL mutations.

First, like many others studies, we reported a high hematological response rate in ET/PV/MF irrespective of genotype JAK2^{V617F}, CALR or MPL mutations (Kiladjian et al., 2008; Kjaer et al., 2016; Masarova et al., 2017; Quintas-Cardama et al., 2013; Silver, 1988). Moreover, we observed that the JAK2V617F hematological non-responders present a PV phenotype.

Second, we have investigated the kinetics of molecular responses not only in mature cells but also in HSPC in JAK2^{V617F} and CALR-mutated patients. We observed a 40% molecular response with 8% CMR in the mature cells (granulocytes or platelets) of JAK2^{V617F} ET/PV patients after a median follow-up time of 33 months. This rate was slightly increased after a median 51 months follow-up. These response rates are lower than those found by Kiladjian *et al*, which were 59% after a median follow-up of 12 months and 72% beyond in JAK2^{V617F} PV (Kiladjian et al., 2008). Quintas-Cardama *et al*. also reported higher molecular response rates of 60% in PV and 67% in ET after a median follow-up time of 42 months (Quintas-

Cardama et al., 2013). Factors that could explain the underrepresentation of the molecular response in our cohort include diversity of disease phenotypes (PV/ET/MF even if PV are the most represented); type of purified cells for allele burden quantification (granulocytes in our study vs total white blood cells); and IFN α dosage. More importantly, previous treatments were not an exclusion criteria in our study, and patients were generally older and had more variable treatment durations than in the study of Kiladjian and colleagues (Kiladjian et al., 2008). The type of associated mutation – particularly the TET2 mutation – could also be a deleterious factor but is unlikely to be responsible for lower efficacy as only 2 of our 25 patients (8%) had TET2 mutations (Quintas-Cardama et al., 2013).

Molecular response in the granulocytes of CALR mutated ET patients after a median 30 months follow-up (25% with 8% CMR) was also lower than previously found by Verger et al. (64% with 6% CMR) (Verger et al., 2015) and was quite similar to the study of Kjaer *et al* (Kjaer et al., 2016). These discrepancies could be due to the factors suggested above for JAK2^{V617F} patients. Importantly, it seems from the literature and from our results that, unlike in JAK2^{V617F} patients, a crucial parameter of the molecular response in CALR-mutated patients is the number of associated mutations that are present in 1/3 of the cases in CALR cohort (Verger et al., 2015). Finally, we also observed a trend in a better efficacy on JAK2^{V617F} than on CALR mutation, even if it was not significant, indicating that JAK2^{V617F} itself and not the activation of the JAK2/STAT pathway is responsible for IFN α effect.

Based on three lines of evidence: i) MPN diseases are due to acquisition of mutation at the level of hematopoietic stem cells (Delhommeau et al., 2007; Dupont et al., 2007), ii) IFN α was found to target JAK2^{V617F} stem cells in a chimeric knock-in mouse (Hasan et al., 2013; Mullally et al., 2013), and iii) IFN α was able to target human HSPC *in vitro* (Lu et al., 2010b), we investigated the impact of *in vivo* IFN α on HSPC in our cohort. Interestingly, we

always found a higher molecular response in $JAK2^{V617F}$ HSPC than in mature cells and the strongest effect was found in the most immature hematopoietic compartment, with 38% CMR in HSC-enriched progenitors. These results argue for a more rapid and efficient targeting of HSPC compared to mature cells. A similar pattern has been observed in IFN α treatment of CML patients harboring *BCR-ABL* (Angstreich et al., 2005). Our observation that the $JAK2^{V617F}$ allele burden was higher in mature cells than in HSPC could be due either to the very high proliferative advantage of $JAK2^{V617F}$ during hematopoietic differentiation (unless the allele burden in HSC was low) (Dupont et al., 2007) or to granulocytes being generated from long half-life or self-renewing $JAK2^{V617F}$ granulocyte-macrophage progenitors (GMP). The last hypothesis is unlikely since we observed similar results in platelets. In parallel, we evaluated IFN α efficacy in *CALR* mutated HSPC and found no difference compared to granulocytes, indicating that IFN α affects the different hematopoietic compartments equally in *CALR*-mutated patients. Two hypotheses can be postulated. It might be that IFN α acts on HSC but *CALR* mutation has a smaller effect than $JAK2^{V617F}$ mutation on granulocyte differentiation. Alternatively, the mutant *CALR*, which is immunogenic (Holmstrom et al., 2017), may interfere with the IFN α in a immune manner such that all cells are targeted in a similar way. In contrast, we found a significant difference between the targeting of HSC-enriched progenitors and immature progenitors by IFN α in $JAK2^{V617F}$ and *CALR* mutated patient showing a specific effect of $JAK2^{V617F}$ compared the normal *JAK2* activation by *CALR* mutant in HSPC. This $JAK2^{V617F}$ specific effect was also found in Ba/F3 cell lines and primary cells with a sensitization to IFN α signaling (increased signaling and ISGs). Moreover, we have previously shown that IFN α action seems to be correlated with $JAK2^{V617F}$ activity since the $JAK2^{V617F}$ homozygous clone decreases faster than the heterozygous clone (Hasan et al., 2014), and we observed the same pattern in the current

study at the level of HSPC. Altogether, these results suggest that the therapeutic efficacy of IFN α is linked to JAK2V617F levels.

The mechanisms by which IFN α specifically targets *JAK2*^{V617F} or *CALR* mutated clones are still largely unknown. The effect of chronic IFN α on normal mouse HSC is somewhat controversial. One group has found that IFN α induces proliferation and thereby exhaustion of normal HSC (Essers et al., 2009). Another group has found that chronic IFN α induces normal HSC proliferation by relaxation of quiescence but poises the cells for apoptosis (p53 pathway), thereby inducing direct killing of HSC when they are forced back into cycling (Pietras et al., 2014). The role of IFN α in the *JAK2*^{V617F} context is also controversial. IFN α may enhance mutated HSC proliferation (associated with increased expression of cell cycle genes and decreased expression of quiescence genes) or may promote apoptosis of mutated HSC (at least in the spleen) (Hasan et al., 2013; Mullally et al., 2013). Some signaling pathways have been shown to participate in IFN α action in *JAK2*^{V617F}-positive MPN in primary patient cells. IFN α can directly activate apoptosis through the p38/MNK-1 MAPK signaling pathway in HSPC cells (Lu et al., 2010b; Mehrotra et al., 2013). IFN α -induced P53 is an also an important apoptotic factor in *JAK2*^{V617F} HSPC and the combination of IFN α with MDM2 antagonists was shown to synergize strongly, particularly at the HSC level (Lu et al., 2014; Plo, 2014). The *JAK2*/STAT pathway was shown to crosstalk with the IFN α action since MDM2 is a target of *JAK2*^{V617F}. Moreover, *JAK2*^{V617F}-induced BCL-XL may limit IFN α -induced apoptosis in HSPC and the use of ABT-747 inhibitor leads to potentialization of the IFN α action (Lu et al., 2010a). Investigations are in progress to decipher precisely the mechanism induced by IFN α on *JAK2*^{V617F} and *CALR* mutants.

In conclusion, our results show that IFN α differentially targets human *JAK2*^{V617F}- and *CALR*-mutated HSPC and mature cells. The *JAK2*^{V617F} cell targeting was due to a stronger

sensitization of IFN α signaling. Moreover, the molecular response was dependent not only on the *JAK2V617F* or *CALR* mutated status but also on the presence of other associated mutations.

Acknowledgments

We thank the cytometry platform of Gustave Roussy (P. Rameau and Y. Lecluse). This work was supported by grants from MPN Research Foundation, INCA Plbio2014 and INCA Plbio2017 to IP and JLV. Labex GR-Ex (IP, JJK) is funded by the program "Investissements d'avenir". MM was supported by Ph.D grants from la ligue Nationale Contre le Cancer and then Société Française d'Hématologie.

Conflict-of-interest disclosure:

The authors declare no competing financial interests. JJK is consultant at AOP orphan.

REFERENCES

- Angstreich, G.R., Matsui, W., Huff, C.A., Vala, M.S., Barber, J., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Smith, B.D., and Jones, R.J. (2005). Effects of imatinib and interferon on primitive chronic myeloid leukaemia progenitors. *British journal of haematology* *130*, 373-381.
- Barosi, G., Birgegard, G., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H.C., Kiladjian, J.J., Lengfelder, E., McMullin, M.F., Passamonti, F., *et al.* (2009). Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* *113*, 4829-4833.
- Chaligne, R., James, C., Tonetti, C., Besancenot, R., Le Couedic, 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.
- Delhommeau, F., Dupont, S., Tonetti, C., Masse, A., Godin, I., Le Couedic, J.P., Debili, N., Saulnier, P., Casadevall, N., Vainchenker, W., *et al.* (2007). Evidence that the *JAK2 G1849T (V617F)* mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* *109*, 71-77.
- Dupont, S., Masse, A., James, C., Teyssandier, I., Lecluse, Y., Larbret, F., Ugo, V., Saulnier, P., Koscielny, S., Le Couedic, J.P., *et al.* (2007). The *JAK2 617V>F* mutation triggers

erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* *110*, 1013-1021.

Essers, M.A., Offner, S., Blanco-Bose, W.E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M.A., and Trumpp, A. (2009). IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* *458*, 904-908.

Hasan, S., Cassinat, B., Droin, N., Le Couedic, J.P., Favale, F., Monte-Mor, B., Lacout, C., Fontenay, M., Dosquet, C., Chomienne, C., *et al.* (2014). Use of the 46/1 haplotype to model JAK2(V617F) clonal architecture in PV patients: clonal evolution and impact of IFN α treatment. *Leukemia* *28*, 460-463.

Hasan, S., Lacout, C., Marty, C., Cuingnet, M., Solary, E., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2013). JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood* *122*, 1464-1477.

Holmstrom, M.O., Hasselbalch, H.C., and Andersen, M.H. (2017). The JAK2V617F and CALR exon 9 mutations are shared immunogenic neoantigens in hematological malignancy. *Oncoimmunology* *6*, e1358334.

James, C., Ugo, V., Le Couedic, J.P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, 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.

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

Kiladjian, J.J., Cassinat, B., Turlure, P., Cambier, N., Roussel, M., Bellucci, S., Menot, M.L., Massonnet, G., Dutel, J.L., Ghomari, K., *et al.* (2006). High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon α -2a. *Blood* *108*, 2037-2040.

Kiladjian, J.J., Masse, A., Cassinat, B., Mokrani, H., Teyssandier, I., le Couedic, J.P., Cambier, N., Almire, C., Pronier, E., Casadevall, N., *et al.* (2010). Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon α -2a treatment targets JAK2V617F clones without affecting TET2 mutant cells. *Leukemia* *24*, 1519-1523.

Kjaer, L., Cordua, S., Holmstrom, 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 α Treatment. *PLoS One* *11*, e0165336.

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

Lu, M., Wang, J., Li, Y., Berenzon, D., Wang, X., Mascarenhas, J., Xu, M., and Hoffman, R. (2010a). Treatment with the Bcl-xL inhibitor ABT-737 in combination with interferon α specifically targets JAK2V617F-positive polycythemia vera hematopoietic progenitor cells. *Blood* *116*, 4284-4287.

Lu, M., Xia, L., Li, Y., Wang, X., and Hoffman, R. (2014). The orally bioavailable MDM2 antagonist RG7112 and pegylated interferon α 2a target JAK2V617F-positive progenitor and stem cells. *Blood* *124*, 771-779.

Lu, M., Zhang, W., Li, Y., Berenzon, D., Wang, X., Wang, J., Mascarenhas, J., Xu, M., and Hoffman, R. (2010b). Interferon- α targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway. *Exp Hematol* *38*, 472-480.

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.

Masarova, L., Patel, K.P., Newberry, K.J., Cortes, J., Borthakur, G., Konopleva, M., Estrov, Z., Kantarjian, H., and Verstovsek, S. (2017). Pegylated interferon alfa-2a in patients with essential thrombocythaemia or polycythaemia vera: a post-hoc, median 83 month follow-up of an open-label, phase 2 trial. *Lancet Haematol* *4*, e165-e175.

Mehrotra, S., Sharma, B., Joshi, S., Kroczyńska, B., Majchrzak, B., Stein, B.L., McMahon, B., Altman, J.K., Licht, J.D., Baker, D.P., *et al.* (2013). Essential role for the Mnk pathway in the inhibitory effects of type I interferons on myeloproliferative neoplasm (MPN) precursors. *The Journal of biological chemistry* *288*, 23814-23822.

Moulard, O., Mehta, J., Fryzek, J., Olivares, R., Iqbal, U., and Mesa, R.A. (2014). Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *European journal of haematology* *92*, 289-297.

Mullally, A., Bruedigam, C., Poveromo, L., Heidel, F.H., Purdon, A., Vu, T., Austin, R., Heckl, D., Breyfogle, L.J., Kuhn, C.P., *et al.* (2013). Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-alpha in a murine model of polycythemia vera. *Blood* *121*, 3692-3702.

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. *The New England journal of medicine* *369*, 2391-2405.

Pietras, E.M., Lakshminarasimhan, R., Techner, J.M., Fong, S., Flach, J., Binnewies, M., and Passegue, E. (2014). Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *J Exp Med* *211*, 245-262.

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 medicine* *3*, e270.

Plo, I. (2014). p53 at the crossroads of MPN treatment. *Blood* *124*, 668-669.

Quintas-Cardama, A., Abdel-Wahab, O., Manshouri, T., Kilpivaara, O., Cortes, J., Roupie, A.L., Zhang, S.J., Harris, D., Estrov, Z., Kantarjian, H., *et al.* (2013). Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon alpha-2a. *Blood*.

Silver, R.T. (1988). Recombinant interferon-alpha for treatment of polycythaemia vera. *Lancet* *2*, 403.

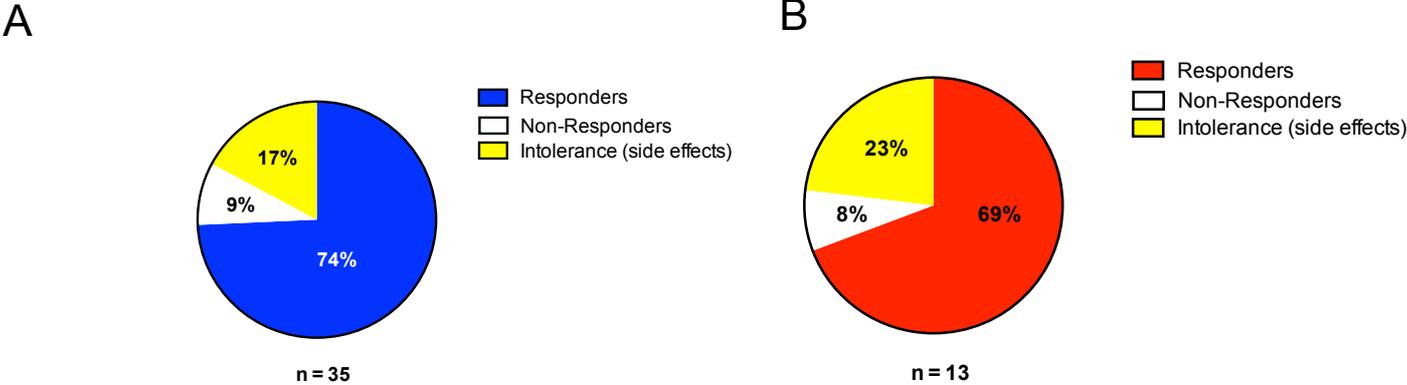
Tiedt, R., Coers, J., Ziegler, S., Wiestner, A., Hao-Shen, H., Bornmann, C., Schenkel, J., Karakhanova, S., de Sauvage, F.J., Jackson, C.W., *et al.* (2009). Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood* *113*, 1768-1777.

Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S.N., and Bernard, O.A. (2011). New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* *118*, 1723-1735.

Vainchenker, W., and Kralovics, R. (2017). Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* *129*, 667-679.

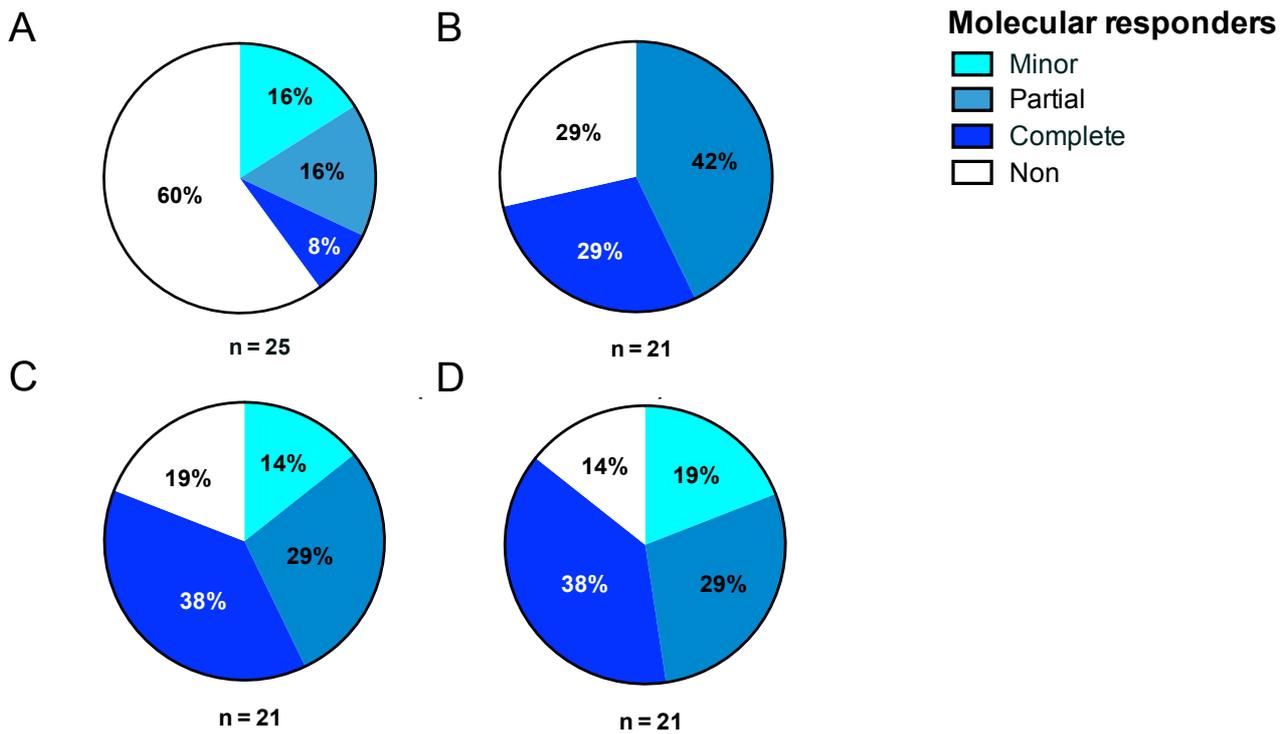
Verger, E., Cassinat, B., Chauveau, A., Dosquet, C., Giraudier, S., Schlageter, M.H., Ianotto, J.C., Yassin, M.A., Al-Dewik, N., Carillo, S., *et al.* (2015). Clinical and molecular response to interferon-alpha therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood* *126*, 2585-2591.

Figure legends



Mosca et al., Figure 1

Figure 1. IFN α induces hematological response in $JAK2^{V617F}$ and $CALR$ -mutated patients. Distribution of the hematological responses in the $JAK2^{V617F}$ (n=35) (A) and $CALR$ -mutated patients (n=13) (B). The % of hematological responders, non-responders and intolerant patients are indicated in the pie chart.

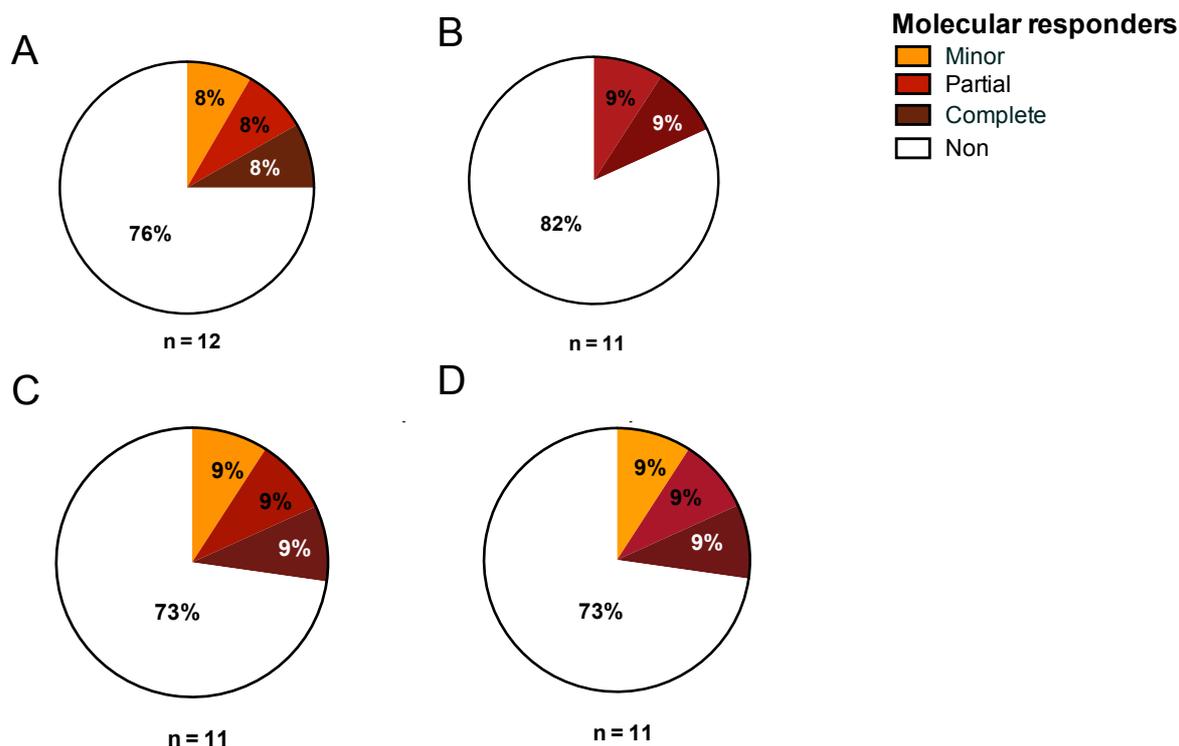


Mosca et al., Figure 2

Figure 2: IFN α induces a higher molecular response in HSPC than in granulocytes in $JAK2^{V617F}$ patients after 33 months of treatment.

Distribution of the molecular responses after a median follow-up of 33 months of $JAK2^{V617F}$ -mutated patients treated with IFN α within the mature granulocyte compartment (n=25) (A) and the different HSPC compartments: CD34⁺CD38⁺ (n=21)(B), CD34⁺CD38⁻CD90⁻ (n=21)(C), CD34⁺CD38⁻CD90⁺ (n=21)(D).

Complete Molecular Response (CMR) means that $JAK2$ mutation has become undetectable, partial MR (PMR) means that $JAK2$ mutation allele burden decreased more than 50%, and minor MR (MMR) means that the $JAK2$ mutation reduced from 25% to 49% before and after a median follow-up of 33 months.

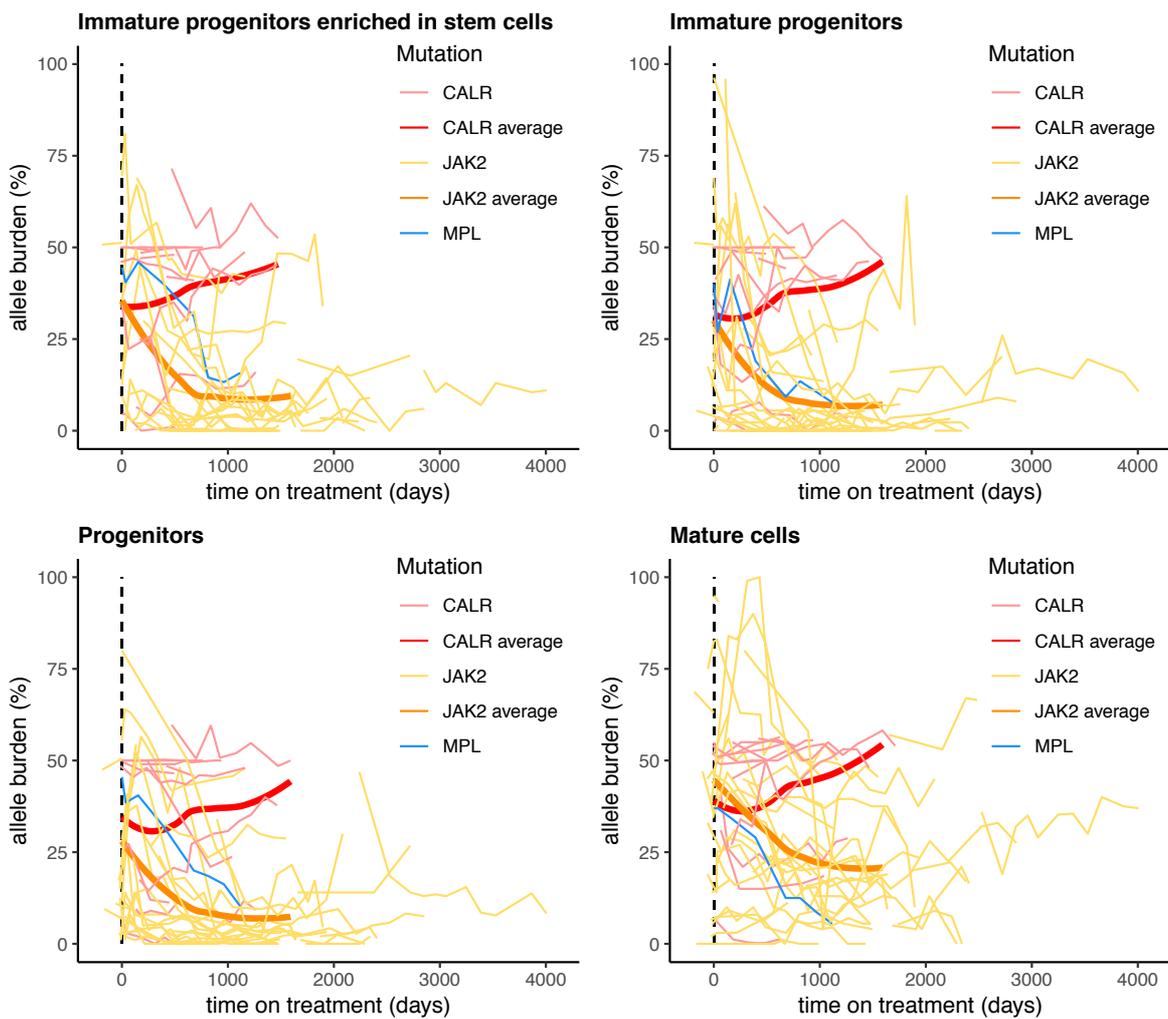


Mosca *et al.*, Figure 3

Figure 3: IFN α induces the same molecular response in HSPC and in granulocytes in *CALR*-mutated patients after 33 months of treatment.

Distribution of the molecular responses after a median follow-up of 33 months of *CALR*-mutated patients treated with IFN α within the mature granulocyte compartment (A) and the different HSPC compartments: CD34⁺CD38⁺ (B), CD34⁺CD38⁻CD90⁻ (C), CD34⁺CD38⁻CD90⁺ (D).

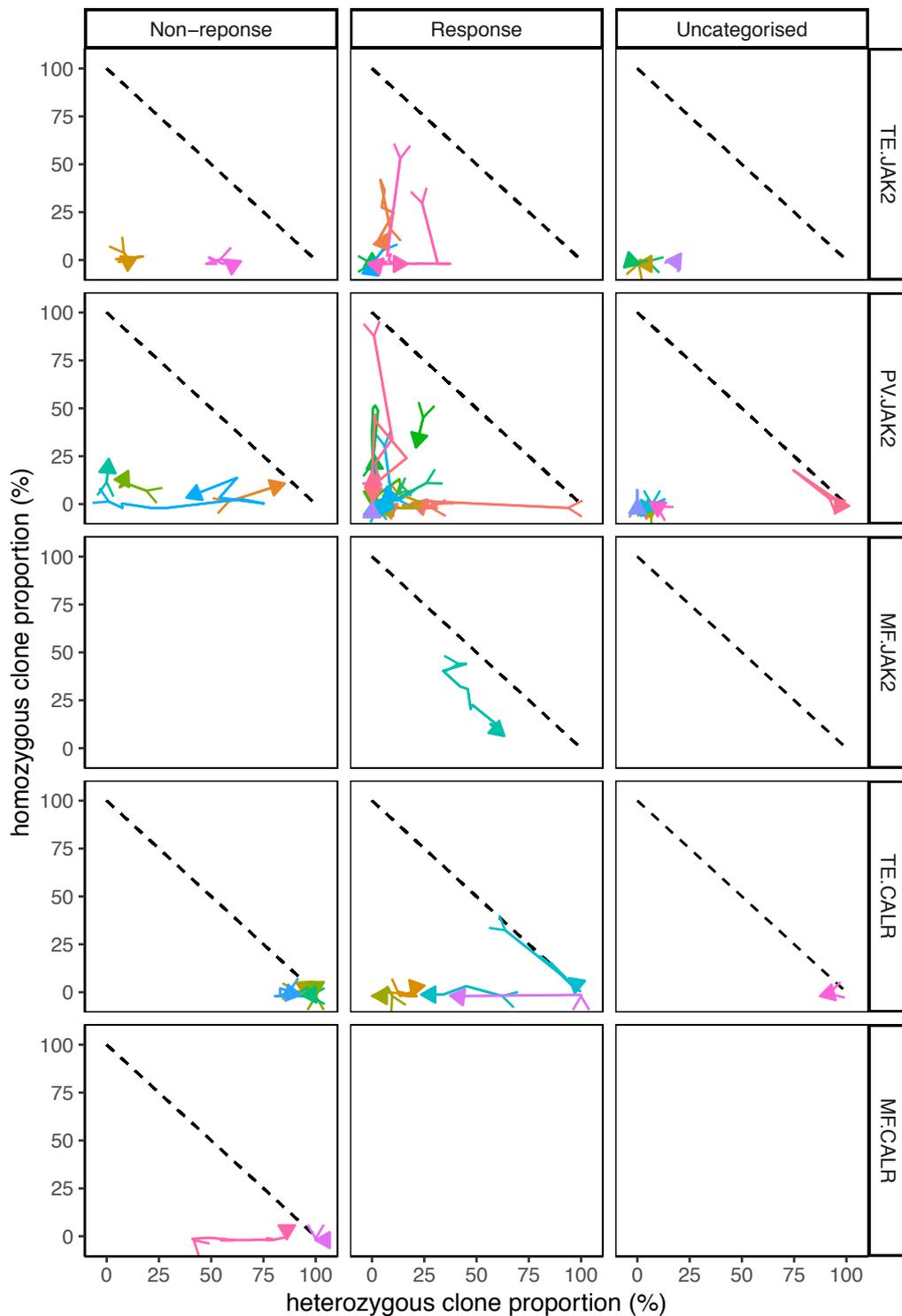
Complete Molecular Response (CMR) means that *CALR* mutation has been reduced to undetectable levels, partial MR (PMR) means that *CALR* mutation allele burden decreased more than 50%, and minor MR (MMR) means that the *CALR* mutation reduced from 25% to 49% before and after a median follow-up of 33 months.



Mosca *et al.*, Figure 4

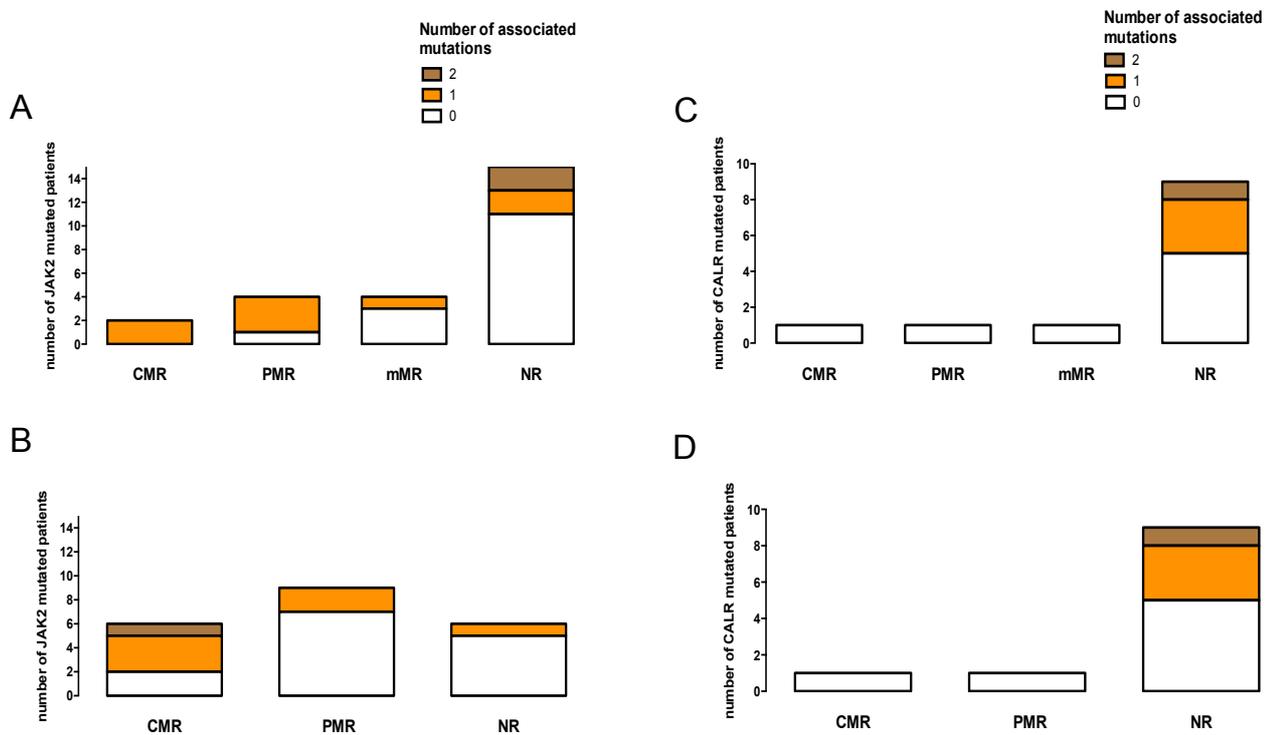
Figure 4: Total allele burden trends in the different hematopoietic compartment for all patients. Each thin line represents data for a single patient. Thick curves are smoothed averages (local regression curves, using the Loess method). Excluded are data for patients based on fewer than ten colonies. Total allele burden is defined as the homozygous mutated clone proportion plus half of the heterozygous mutated clone proportion.

Non-mature cells (mean of three cell types)



Mosca *et al.*, Figure 5

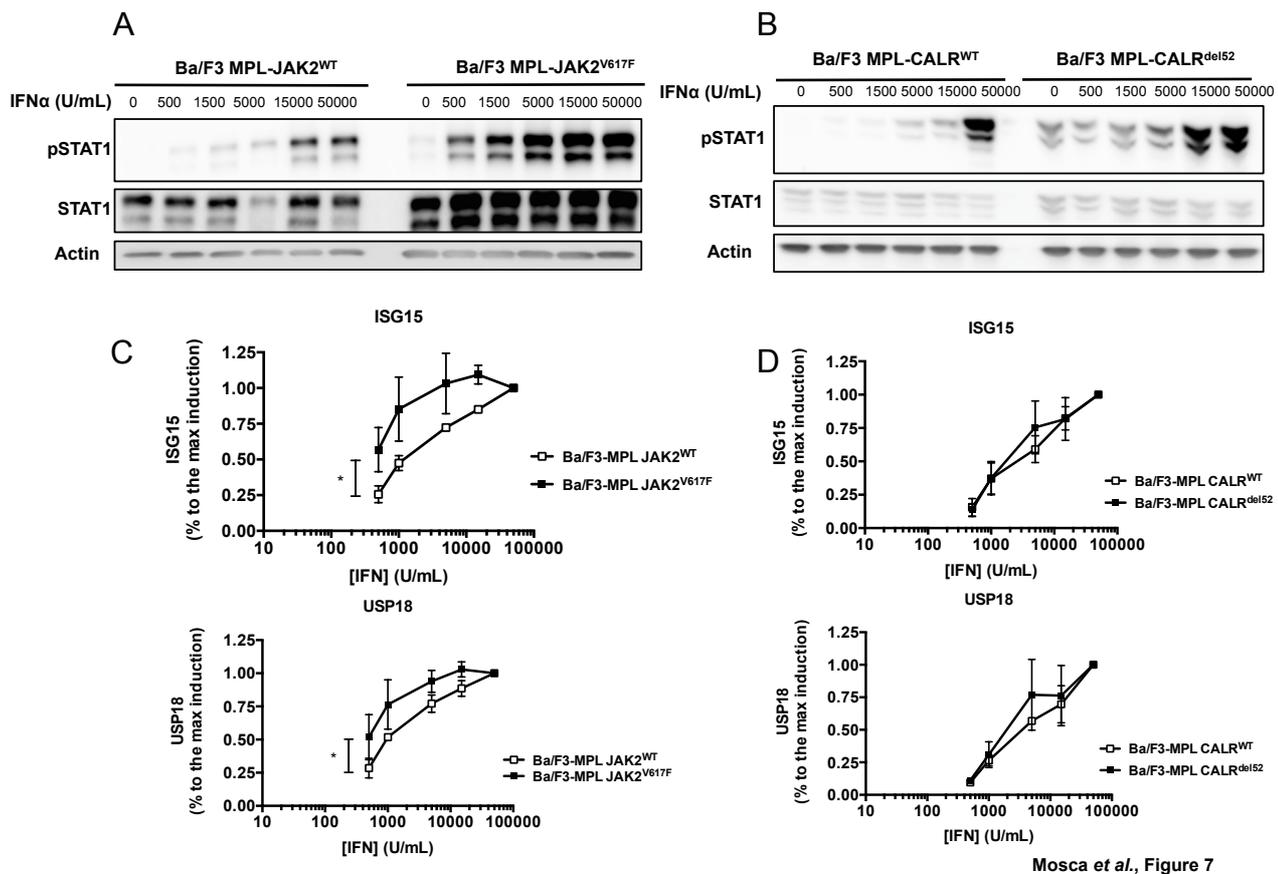
Figure 5: Homozygous and heterozygous proportion dynamics in potential responders and non-responders. Patients are assigned to three groups. The response group contains patients who possibly responded to treatment, based on molecular data. A patient is put in the response group if his allele burden in either non-mature or mature cells decreased between the first and last measurements by at least 5 percentage points (absolute change) and by at least 10% (relative change). Non-response means that the allele burden in non-mature cells increased by at least 5 percentage points or did not decrease and was above 5% at the last measurement. Patients are uncategorized either due to insufficient data or because the allele burden in non-mature cells remained at a low level, so that the treatment effect is unclear. Allele burden in non-mature cells is the average of stem cell, progenitor, and immature progenitor allele burdens (the data for these three cell types are very similar, and the figure would look similar if based on data from only one non-mature cell type). First panel: homozygous clone proportion versus heterozygous clone proportion in non-mature cells. Arrows show trajectories over time. Each patient has a unique colour. The start point of each trajectory is marked with an open arrowhead, pointing in the initial direction; the final point is marked with a closed arrowhead, pointing in the final direction. Where homozygous clone proportions are equal to zero, a small amount of random noise (jittering) has been added to make the trajectories clearer. Because the two proportions cannot add to more than 100%, all trajectories remain below the dashed black line. Excluded are data measurements based on fewer than ten colonies.



Mosca *et al.*, Figure 6

Figure 6: The number of associated mutations has no impact on the IFN α -mediated molecular responses of $JAK2^{V617F}$ patients contrary to $CALR$ -mutated patients.

A, B Number of $JAK2^{V617F}$ associated mutations at the beginning of IFN α treatment depending on the molecular response of patients in granulocytes (n=25)(A) and hematopoietic progenitor cells (n=21) ($CD34^+CD38^+$) (B). C, D Number of $CALR^m$ associated mutations at the beginning of IFN α treatment depending on the molecular response of patients in granulocytes (n=12)(C) and hematopoietic progenitor cells (n=11) ($CD34^+CD38^+$) (D).

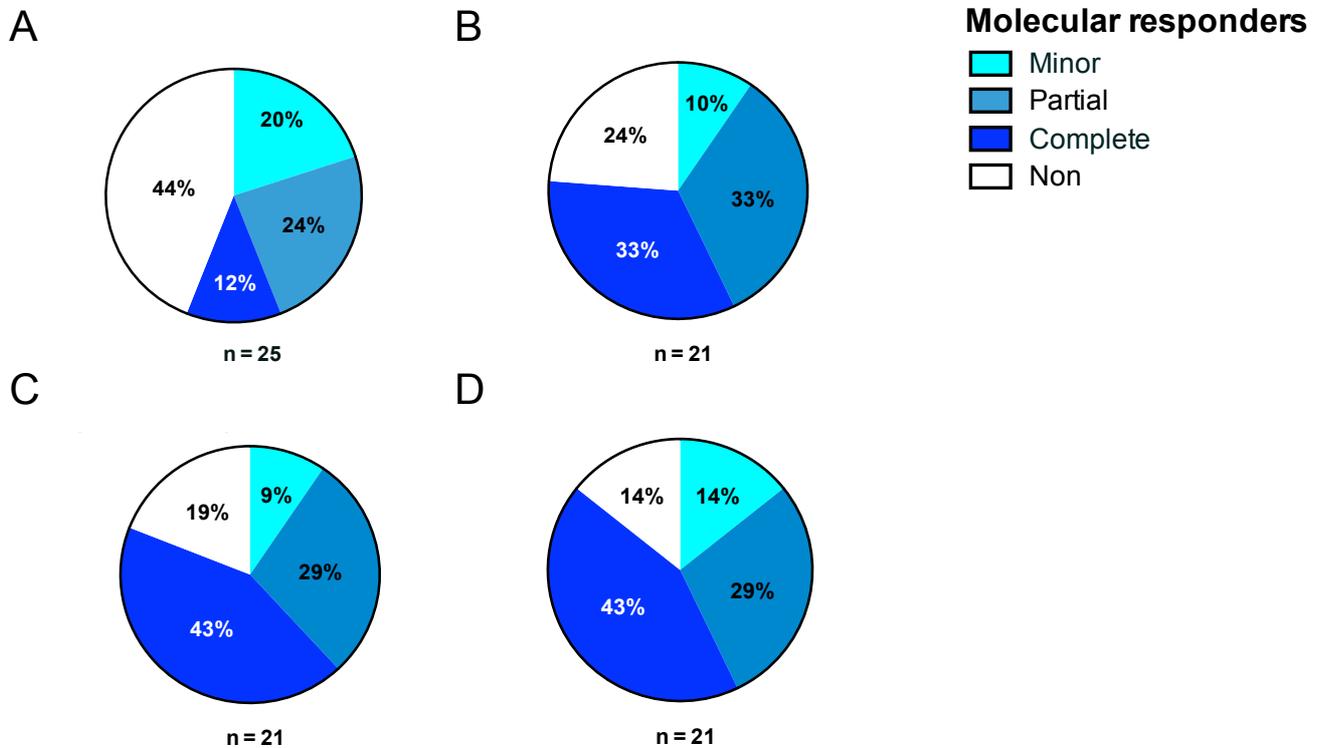


Mosca et al., Figure 7

Figure 7: JAK2^{V617F} but not CALR^{del52} sensitizes cells to IFN α

A, B: Ba/F3-MPL cells overexpressing JAK2^{WT}, JAK2^{V617F}, CALR^{WT}, or CALR^{del52} were starved for 6 hours and stimulated for 15 min with various concentrations of murine IFN α (0 to 50,000 U/mL) and phosphorylated STAT1 and total STAT1 were analysed by western blotting. Actin was used as a loading control. Blots are representative of 3 independent experiments. C, D Ba/F3-MPL cells overexpressing either JAK2^{WT} or JAK2^{V617F} or CALR^{WT} or CALR^{del52} were treated 6 hours with various concentrations of murine IFN α (0 to 50,000 U/mL) and ISG15 and USP18 transcripts were quantified by qRT-PCR in JAK2 (C) or CALR mutated (D) context. The % of ISG15 or USP18 induction compared to the induction at maximum IFN α concentration was calculated. Mean \pm SEM, (n=3) (* represents P<0.05, Paired t test).

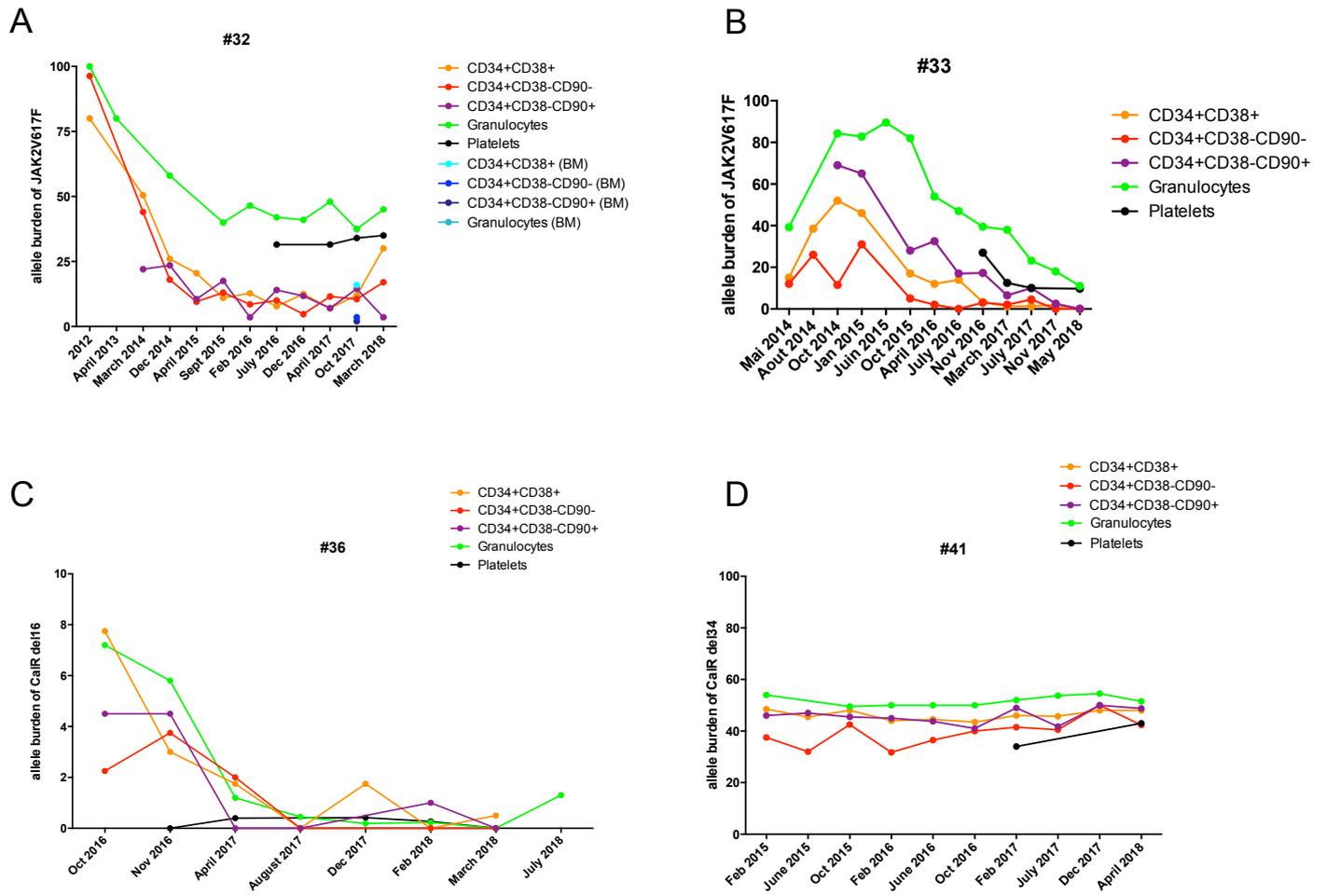
Supplemental figures



Mosca et al., Supp Figure 1.

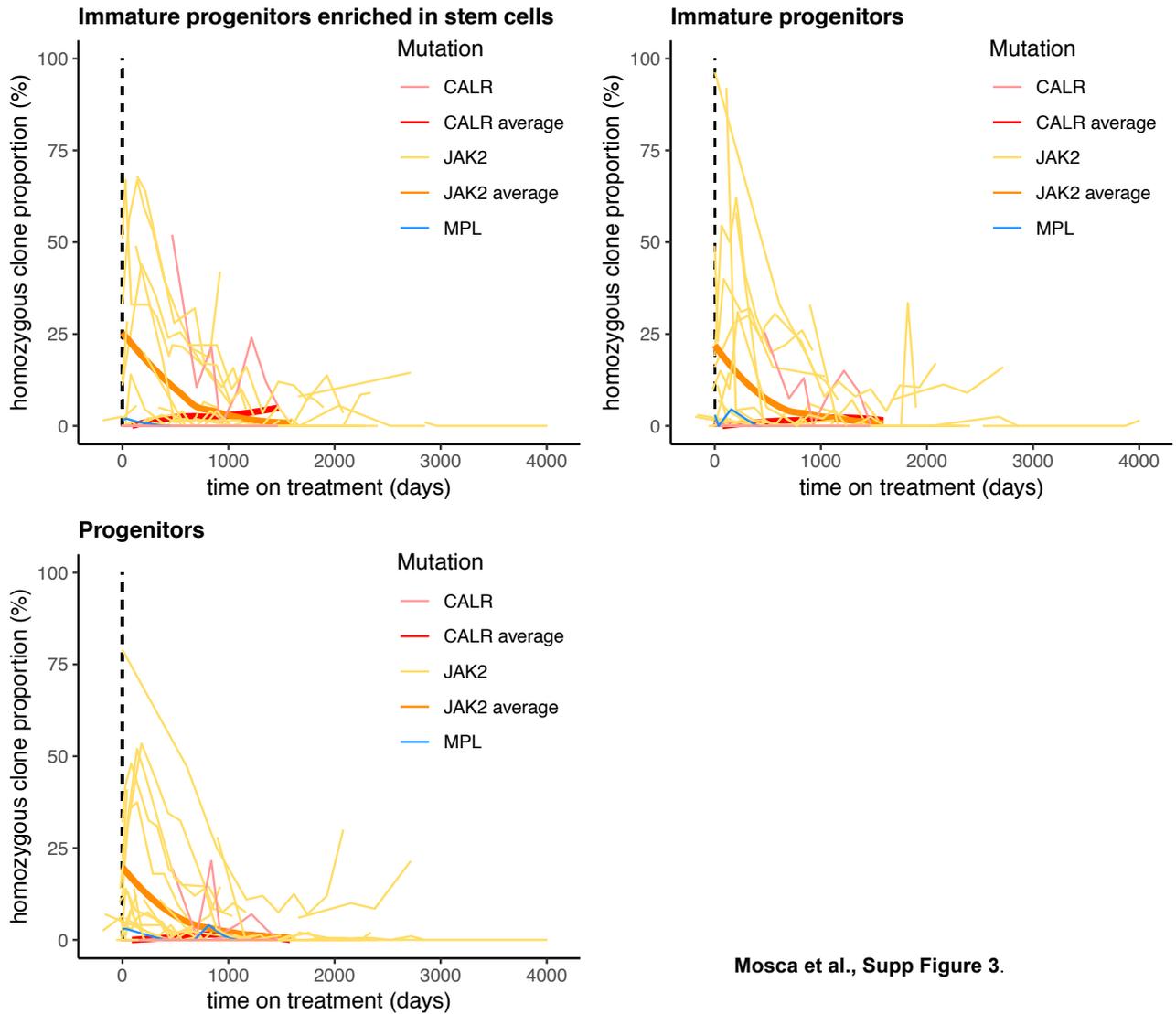
Supplemental Figure 1: IFN α induces higher molecular response in HSPC than in granulocytes in $JAK2^{V617F}$ patients after 51 months of treatment.

Distribution of the molecular responses after a median follow-up of 51 months of $JAK2^{V617F}$ -mutated patients treated with IFN α within the mature granulocyte compartment (n=25) (A) and the different HSPC compartments: CD34⁺CD38⁺ (n=12)(B), CD34⁺CD38⁻CD90⁻ (n=11)(C), CD34⁺CD38⁻CD90⁺ (n=11)(D).



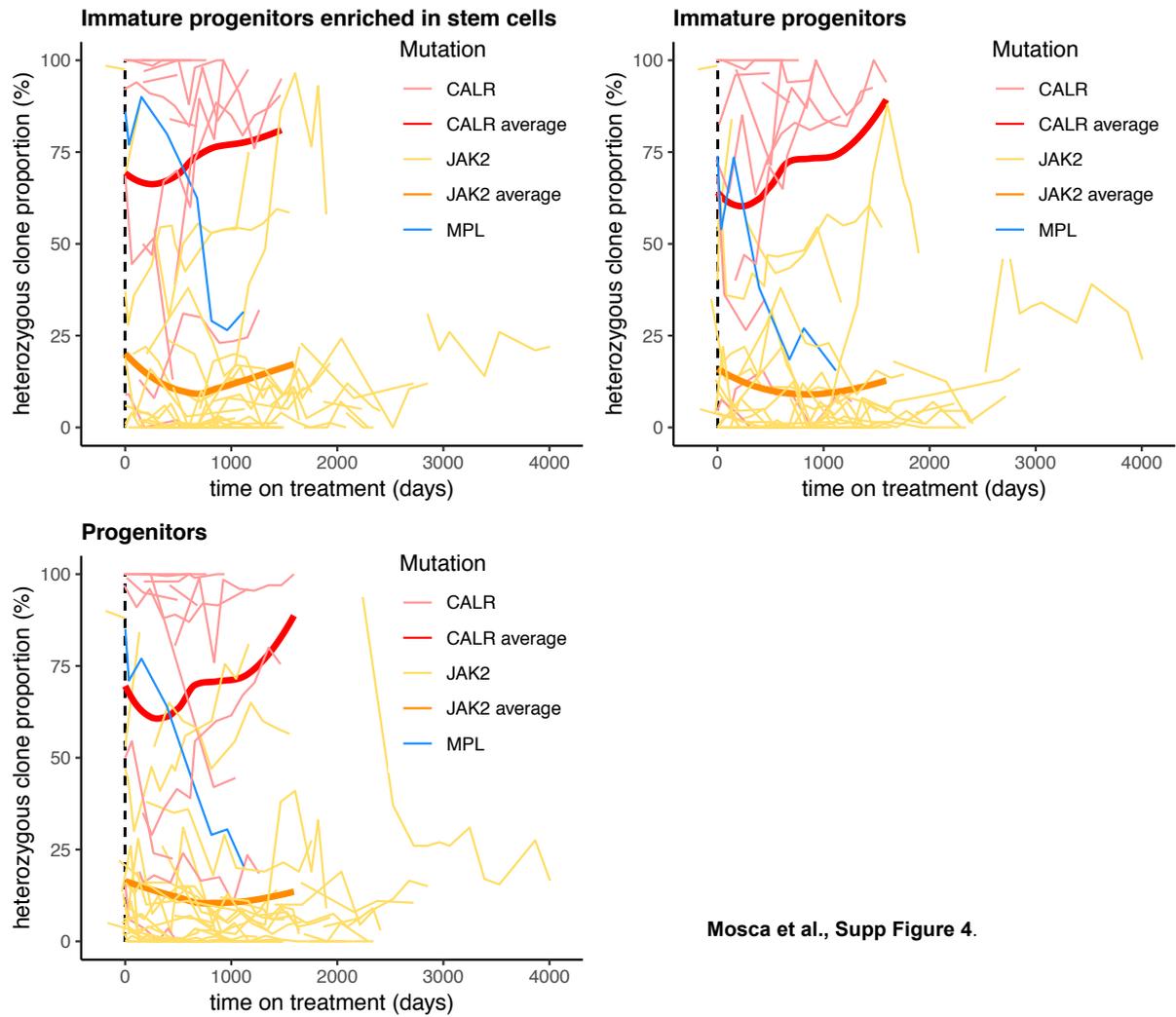
Mosca et al., Supp Figure 2.

Supplemental Figure 2: Examples of allele burden of $JAK2^{V617F}$ and $CALR$ mutated patients during the follow up in the different hematopoietic compartments.



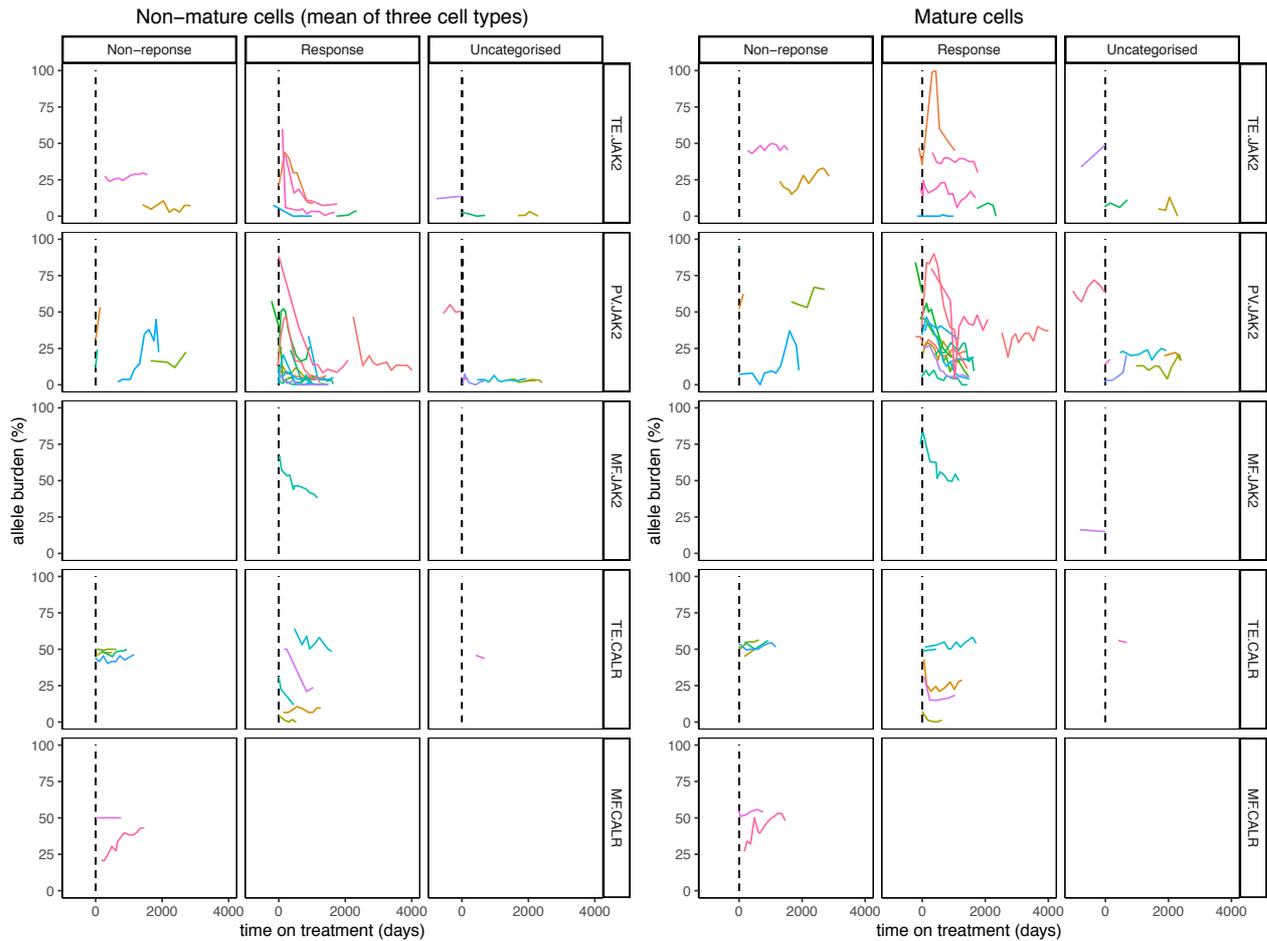
Mosca et al., Supp Figure 3.

Supplemental Figure 3: Homozygous clone proportion trends in HSPC. Each thin line represents data for a single patient. Thick curves are smoothed averages (local regression curves, using the Loess method). Excluded are data for measurements based on fewer than ten colonies.



Mosca et al., Supp Figure 4.

Supplemental Figure 4: Heterozygous clone proportion trends in HSPC. Each thin line represents data for a single patient. Thick curves are smoothed averages (local regression curves, using the Loess method). Excluded are data for measurements based on fewer than ten colonies.



Mosca *et al.*, Supp Figure 5.

Supplemental Figure 5: Allele burden dynamics in potential responders and non-responders. Patients are assigned to three groups. The response group contains patients who possibly responded to treatment, based on allele burden data. A patient is put in the response group if their allele burden in either non-mature or mature cells decreased between the first and last measurements by at least 5 percentage points (absolute change) and by at least 10% (relative change). Non-response means that the allele burden in non-mature cells increased by at least 5 percentage points or did not decrease and was above 5% at the last measurement. Patients are uncategorized either due to insufficient data or because the allele burden in non-mature cells remained at a low level, so that the treatment effect is unclear. Allele burden in non-mature cells is the average of stem cell,

progenitor, and immature progenitor allele burdens (the data for these three cell types are very similar, and the figure would look similar if based on data from only one non-mature cell type). First and second panels: allele burdens in non-mature and mature cells (respectively) over time. Excluded from all panels are data for allele burden measurements based on fewer than ten colonies.

Supplemental Table S1

Table of the general information of all the patients studied. Table present the patient number, gender, age at the beginning of the treatment, disease driver and associated mutations, IFN follow-up, hematological responses, general observation, and molecular responses in the different hematopoietic compartment at start and at the end of the treatment.

HR: hematological responder, SE: side effect, CMR: complete molecular response, PMR: partial molecular response, mMR: minor molecular response.

Supplemental Table S2: Molecular responses depending on the *JAK2*^{V617F} associated mutations in granulocytes and progenitors CD34⁺CD38⁺.

Supplemental Table S3: Molecular responses depending on the *CALR*-mutated associated mutations in granulocytes and progenitors CD34⁺CD38⁺.

Supplemental Table S4: Sequences of ISG15, USP18 and HPRT primers murine genes.

	Patient	Time of treatment (months)	Initial allele burden (%)	Allele burden after 33 months (%)	TET2	NFE2	TP53	CSF3R	SF3B1	NRAS	CBL	PRPF40B	SUZ12	PTPN11
CMR	#25	36	1	0										
	#46	51	2	0										
	#11	51	47	17										
PMR	#21	51	34	8										
	#26	54	32	5										
	#32	69	100	48										
mMR	#1	135	50	30										
	#8	55	22	16										
	#20	68	27	17										
	#30	58	19	11										
NR	#2	51	33	25										
	#3	40	47	60										
	#5	23	20	22										
	#10	34	57	67										
	#13	36	45	34										
	#15	24	7	11										
	#16	27	20	16										
	#17	51	5	4										
	#19	42	75	54										
	#23	47	25	32										
	#24	59	7	8										
	#45	30	2	6										
	#28	53	45	50										
#31	61	44	39											
#33	51	39	38											

Granulocytes

	Patient	Time of treatment (months)	Initial allele burden (%)	Allele burden after 33 months (%)	TET2	NFE2	TP53	CSF3R	SF3B1	PRPF40B	SUZ12
CMR	#11	51	17	0							
	#17	51	12	0							
	#25	36	10	0							
	#45	30	1	0							
	#26	54	8	0							
	#46	51	1	0							
PMR	#1	135	47	8							
	#2	51	11	5							
	#15	24	3	1							
	#21	51	14	2							
	#23	47	12	5							
	#30	58	23	3							
	#31	61	30	9							
NR	#32	69	80	7							
	#33	51	15	1							
	#3	40	27	34							
	#5	23	2	3							
	#8	55	4	5							
	#10	34	14	27							
NR	#13	36	12	10							
	#19	42	56	48							

Committed progenitors (CD38⁺)

Mosca et al., Supp Table 2.

	Patient	Time of treatment (months)	Initial allele burden (%)	Actual allele burden (%)	TET2	ASXL1	EZH2	TP53	SF3B1
CMR	#36	18	7	0					
PMR	#42	39	50	18					
mMR	#34	48	43	29					
NR	#35	22	45	50					
	#37	33	52	54					
	#38	16	55	53					
	#40	59	51	54					
	#41	43	54	51					
	#45	30	45	43					
	#43	29	55	54					
	#44	33	56	55					
#46	51	27	48						

Granulocytes

	Patient	Time of treatment (months)	Initial allele burden (%)	Actual allele burden (%)	TET2	ASXL1	EZH2	TP53	SF3B1
CMR	#36	18	8	0.5					
PMR	#42	39	50	24					
NR	#35	22	49	46					
	#37	33	50	50					
	#38	16	49	49					
	#40	59	60	50					
	#41	43	49	48					
	#45	30	27	29					
	#43	29	50	50					
	#44	33	49	46					
#46	51	18	38						

Committed progenitors (CD38⁺)

Mosca et al., Supp Table 3.

Murine Gene	Forward Primers (5'-3')	Reverse Primers (5'-3')	Fragment length (bp)	Genbank accession no.
ISG15	GACTCCTTAATTCAGGGGACCT	GGGCAATCTGCTTCTTCAGTTCT	142	NM_015783.3
USP18	CCTGGAAGGATGTCCAGTGT	TTGAAATGCAGCAGACAAGG	165	NM_011909.2
HPRT	CTGGTGAAAAGGACCTCTCG	TGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCA	109	NM_013556.2

Mosca et al., Supp Table 4.

Supplemental methods

Next-generation targeted sequencing

The 77 myeloid genes panel includes:

ABL1 (Chr9; NM_007313 ;exons4-9), *ADGRV1*(chr5 ; NM_032119 ; exons1-90), *ANKRD26* (Chr10 ; NM_014915 ; exon1 et 5'UTR), *APC* (chr5 ; NM_001127510;exons1-15), *ASXL1*(chr20;NM_015338;exons11-12), *ASXL2*(chr2;NM_018263;exons11-12), *ATG2B* (Chr14 ; 20 polymorphismes), *ATM*(chr11;NM_000051;exons2-63), *ATRX* (chrX ; NM_000489 ; exons1-35), *BCOR* (chrX; NM_001123385;exons3-16), *BCORL1* (chrX ; NM_001184772 ; exons1-13), *BRAF* (Chr7 ; NM_004333 ; exon15), *CALR*(Chr19;NM_004343;exon9), *CBL*(chr11;NM_005188;exons4, 8-9,12,16),*CEBPA*(chr19;NM_001287424;exon1 codant), *CHEK2* (chr22 ; NM_001005735 ;exons3-16), *CREBBP* (chr16 ; NM_004380 ; exons1-31), *CSF3R*(chr1; NM_156039 ; exons14 et 17), *CUX1*(chr7 ; NM_001202543 ; exons1-24), *DDX41*(chr5;NM_016222;exons1-17), *DDX54* (chr12 ; NM_001111322 ; exons1-20), *DHX29* (chr5 ; NM_019030 ; exons1-27), *DIS3* (chr13 ; NM_014953 ; exons1-21), *DNMT3A*(chr2; NM_022552;exons2-23), *EED* (chr11 ; NM_001308007 ; exons1-13), *EP300* (chr22 ; NM_001429 ; exons1-31), *EPOR* (chr19 ; NM_000121 ; exon 8), *ERBB4* (chr2 ; NM_005235 ; exons1-28), *ETNK1*(chr12 NM_018638; exon3), *ETV6* (chr12 ; NM_001987 ; exons1-8), *EZH2*(chr7;NM_004456;exons2-20), *FLT3*(chr13;NM_004119;exons8-21), *GATA1* (chrX ;

NM_002049 ; exon2-4), GATA2(chr3;NM_032638;exons4-6 ; c.1017_462-703), HRAS(chr11; NM_005343;exons2-3 et Codon 117dans exon4), IDH1(chr2; NM_005896, Codons 130-134 dans exon4), IDH2(chr15; NM_002168 ; exon4), JAK2(chr9;NM_004972;exons3-25 ; 46/1 Haplotype ; c.*122G>A), KDM6A (ChrX; NM_001291415 ; exons1-30), KMT2A(chr11;6 polymorphismes), KIT(chr4;NM_000222;exons2, 8-17), KRAS(chr12; NM_033360 ; exons2 et 4 ; codons57-64 dans exon3), MPL(chr1;NM_005373;exons1-12), MYC(chr8; NM_002467 ; exon2),NF1(chr17;NM_001042492;exons1-58), NFE2 (chr12 ; NM_001261461 ; exons3-4), NPM1(chr5;NM_002520;exon11), NRAS(chr1;NM_002524;exons2-3),PHF6(chrX;NM_001015877;exons2-10), PPM1D(chr17 ; NM_003620 ; exon6), PRPF40B (chr12 ; NM_001031698 ; exons1-26), PRPF8 (chr17 ; NM_006445 ; exons2-43), PTPN11(chr12;NM_002834 ;exons3-4;8;11-13), RAD21(chr8;NM_006265;exons2-14), RUNX1(chr21;NM_001001890;exons3-9), SETBP1(chr18;NM_015559;exon4), SETD2 (chr3 ; NM_014159; exons5-9), SF1 (chr11 ; NM_004630 ; exons1-13), SF3A1(chr22 ; NM_005877 ; exons1-16), SF3B1(chr2;NM_012433;exons13-16), SH2B3(chr12; NM_005475 ; exons 2-8), SIMC1 (chr5 ;NM_001308195 ; exons2-10), SMC1A(chrX ;NM_6306;exons1-25), SMC3(chr10;NM_5445 ;exons1-29), SRP72 (chr4 ; NM_006947 ; exons1-19), SRSF2(chr17; NM_001195427 ; exon1), STAG2(chrX;NM_001042749;exons3-35), SUZ12 (chr17 ; NM_015355 ; exons1-16), TERC (chr3 ; NR_001566), TERT (chr5 ; NM_198253 ; exons1-16), TET2(chr4;NM_001127208;exons3-11), THPO (chr3 ; NM_001289998 ; 5'UTR),TP53(chr17; NM_001126112 ; exons2-11 ; NM_001126113_Exon 10; NM_001126114_Exon 10), U2AF1(chr21;NM_001025203; codon 34 dans exon2 et codon 157 dans exon 6), U2AF2(chr19 ;NM_007279 ; exons1-12), WT1(chr11;NM_024426;exons1-4 ; 7-9), ZRSR2(chrX;NM_005089;exons1-11).

Conclusion

Au total, les résultats de cette première partie ont permis de valider les résultats déjà observés dans le modèle murin KI $JAK2^{V617F}$ en montrant que l'IFN α ciblait plus particulièrement les populations progénitrices enrichies en CSH chez les patients $JAK2^{V617F}$ et ce, beaucoup plus rapidement que les cellules matures. Le ciblage se fait préférentiellement sur les clones homozygotes $JAK2^{V617F}$ au détriment des hétérozygotes persistants et des sauvages. Les patients mutés *CALR* semblent plus résistants à l'IFN α que les patients $JAK2^{V617F}$. Toutefois, chez les patients *CALR* répondeurs, l'IFN α semble cibler aussi bien les compartiments progéniteurs que les cellules matures.

Ces différences de réponse à l'IFN α entre les patients $JAK2^{V617F}$ et $CALR^{mut}$ nous invitent ainsi à émettre l'hypothèse que $JAK2^{V617F}$ a une propriété particulière sur la signalisation de l'IFN α par rapport à l'activation de la voie JAK2/STAT déclenchée par la $CALR^{mut}$.

De plus, le ciblage préférentiel des clones homozygotes $JAK2^{V617F}$ témoigne d'un lien étroit entre la réponse à l'IFN α et la signalisation induite par $JAK2^{V617F}$.

Partie 2. Etude des interrelations entre la signalisation induite par JAK2 et celle de l'IFN α dans les cellules primaires de patients et dans les lignées murines.

Afin d'étudier le lien entre la signalisation de l'IFN α et la présence de JAK2^{V617F}, j'ai émis deux modèles mécanistiques : JAK2^{V617F} induit un amorçage (« priming ») indirect de la signalisation de l'IFN α étant donné que la voie MPL/JAK2 active STAT3 et 5 mais également STAT1, ce qui induirait des niveaux augmentés de STAT1 (**Figure 21A**), ou bien un amorçage direct par une interaction illégitime de JAK2^{V617F} avec JAK1, TYK2 ou IFNAR1/2 et donc une potentielle augmentation de la phosphorylation de STAT1, STAT2 ou STAT5 (**Figure 21B**). Ces deux modèles auraient pour conséquence une pré-activation (« priming ») de la voie de signalisation de l'IFN α dans les cellules JAK2^{V617F} en induisant par la suite un ciblage préférentiel de ces clones par apoptose, sénescence, arrêt du cycle cellulaire et/ou perte de l'auto-renouvellement. Il est également possible qu'il y ait une combinaison de l'un et l'autre de ces processus.

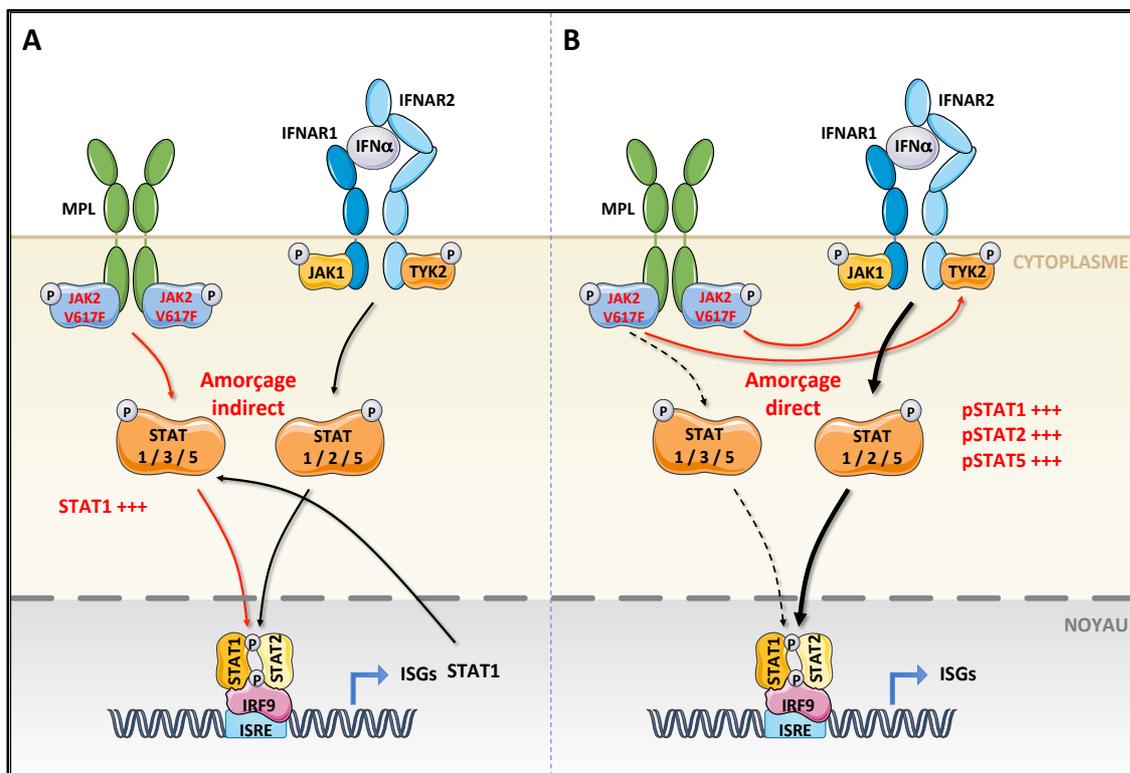


Figure 21. Les modèles d'action mécanistiques de JAK2^{V617F} sur la réponse à l'IFN α . Le ciblage préférentiel du clone JAK2^{V617F} par l'IFN α peut s'expliquer par une première hypothèse selon laquelle JAK2^{V617F} induirait un amorçage indirect de la voie de l'IFN α médiée par la voie MPL/JAK2^{V617F} (A) ou par une deuxième hypothèse selon laquelle JAK2^{V617F} activerait la voie de l'IFN α en interagissant directement avec un des ses composants: JAK1, TYK2 ou IFNAR1/2 (B). Les deux hypothèses induiraient la phosphorylation accrue de STAT1/2 et la suractivation d'ISGs (notamment STAT1).

Matériels et méthodes

Lignées cellulaires Ba/F3

Les cellules de lignée Ba/F3 sont des progéniteurs de lymphocyte B murins dépendantes de l'IL-3. Ces cellules ont été transduites par un rétrovirus afin qu'elles expriment le récepteur MPL et surexpriment JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F}. Ces cellules sont maintenues en culture cellulaire dans un milieu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) supplémenté de sérum de veau foetal (SVF) (10%), pénicilline/streptomycine (1%), glutamine (1%) et un surnageant de cellules WEHI qui produisent l'IL-3 (5%).

Cellules primaires humaines

Nous avons utilisé comme contrôles, des cellules primaires de donneurs mobilisés au G-CSF issues d'une cytophérèse. Nous obtenons alors un prélèvement sanguin enrichi en progéniteurs hématopoïétiques.

Les cellules de patients proviennent de prélèvements sanguins d'un patient atteint de MF, portant la mutation JAK2^{V617F} avec une charge allélique de 100%. Ces prélèvements proviennent de l'hôpital Saint Louis et ont été collectés après que les patients ont signé un consentement éclairé et ont déclaré à la CNIL.

Isolation des progéniteurs CD34⁺

Afin d'étudier l'effet de l'IFN α *in vitro* sur les cellules primaires, nous avons isolé les cellules progénitrices du sang. Le sang est d'abord séparé par une première étape de centrifugation à 900 rpm pendant 10 minutes à 20°C. Cette étape permet d'obtenir deux phases : un surnageant jaune contenant le sérum enrichi en plaquettes et un culot rouge qui contient les autres cellules.

Le culot est alors récupéré et repris dans une solution de phosphate buffered saline (PBS) contenant de l'Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) (anticoagulant) à 0,1% et séparé par gradient de densité sur ficoll (20 ml de ficoll pour 30 ml d'échantillon de sang dilué). Après centrifugation à 2200 rpm pendant 20 minutes à 20°C, les cellules mononucléées (CMN) dans l'anneau qui contient les lymphocytes et les cellules progénitrices d'intérêt sont récupérées.

Les CMN sont incubées avec des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre le marqueur de surface CD34 en présence d'un Fc blocker (pour éviter les

fixations non-spécifiques) 30 minutes à 4°C. Les cellules sont lavées, reprises dans du PBS et passées à l'AUTOMACS, un appareil qui contient un aimant permettant de purifier une population de cellules grâce aux anticorps couplés aux billes magnétiques. Cette étape permet d'avoir une population enrichie en cellules progénitrices CD34⁺ qui est ensuite lavée avec du PBS.

Culture cellulaire des progéniteurs

Les cellules CD34⁺ sont ensuite mises en culture pendant 5 jours dans un milieu sans sérum (MSS) à base de BSA bicarbonatée 10%, de liposomes, d'insuline transferrine sélénium et de Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) supplémenté en pénicilline, streptomycine, glutamine et α -monothioglycérol réalisé au laboratoire et complémenté en cytokines permettant l'amplification des progéniteurs (**tableau 5**) à environ 300 000 cellules/mL.

Facteurs de croissance	Concentration finale
FLT3-L	10 ng/mL
IL-3	10 ng/mL
IL-6	10 ng/mL
SCF	25 ng/mL
TPO	10 ng/mL

Tableau 5 : Facteurs de croissance utilisés en culture cellulaire. Ces facteurs sont impliqués dans permettent l'amplification des progéniteurs.

Isolation des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ de patients provenant de la cohorte traitée *in vivo* à l'IFN α pour la qPCR à haut débit sur cellule unique

Afin d'étudier l'effet de l'IFN α *in vivo* à l'échelon cellulaire sur les cellules primaires, nous avons isolé les progéniteurs hématopoïétiques de la même manière que précédemment. Une fois que la population enrichie en CD34⁺ est isolée par l'AUTOMACS, les progéniteurs sont alors incubés avec des fluorochromes couplés à des anticorps (Becton Dickinson) dirigés contre les marqueurs de surface CD34 (CD34-FITC) et CD38 (CD38-PE) durant 30 minutes, à 4°C et à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées, reprises dans du PBS et la population CD34⁺CD38⁺

est alors triée sur un trieur cellulaire BD Influx et récupérée dans du milieu de culture MSS sans cytokine préalablement filtré à 0,1 µm.

Effets dose de l'IFN α sur cellules primaires de patients

Après 5 jours de culture en MSS + cytokines, les cellules sont récupérées et lavées 3 fois. Les cellules sont ensuite sevrées en cytokines dans un milieu IMDM pendant 3 heures à 300 000 cellules/mL. Les cellules sont ensuite pré-incubées par des inhibiteurs de JAK2 : le ruxolitinib et le BMS911543 à des concentrations différentes (0/100/1000nM) pendant 3 heures et stimulées 15 minutes à des doses croissantes (0/10/100/1000U/mL) par de l'IFN α humain. Ceci permet d'analyser la signalisation par Western blot. La même expérience est réalisée avec une stimulation de 3 heures à l'IFN α pour pouvoir analyser l'expression de gènes cibles de l'IFN α par qRT-PCR (Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction).

Effets dose et effets temps de l'IFN α sur lignées murines Ba/F3

Les cellules sont lavées dans du PBS puis sevrées du sérum et de l'IL-3 dans du milieu IMDM+P/S+ α -monothioglycérol pendant 6 heures à 700 000 cellules/mL. Elles sont ensuite stimulées à l'IFN α murin pendant 15 min à des doses croissantes (0/500/1500/5000/15 000/50 000U/mL) ou à des temps différents (0/15min/30 min/1h/3h/6h) à 5000 U/mL pour l'analyse par WB et à 3 heures pour l'analyse des gènes cibles par qRT-PCR.

Effets des inhibiteurs de JAK2 sur les voies de signalisation activées par l'IFN α et la TPO sur lignées murines Ba/F3

Après sevrage pendant 6 heures, les cellules sont traitées par les inhibiteurs de JAK2 à différentes doses (0/10/100/1000nM) pendant 3 heures puis stimulées pendant 15 minutes soit à l'IFN α murin (5000 U/mL), soit par la TPO (20 ng/mL). Cette cytokine permet l'activation de MPL et donc d'activer la voie normale cytokines/JAK/STAT. On pourra donc comparer l'effet des inhibiteurs sur les voies de l'IFN α et de la TPO. La même expérience a été réalisée en stimulant à l'IFN α murin à plus faible dose (500U/mL) pendant 3 heures pour voir ultérieurement les effets sur l'expression d'ISG15, un gène cible de l'IFN α .

Analyse des effets de la stimulation aux différentes cytokines et inhibiteurs de JAKs sur leur signalisation par Western Blot sur lignées murines Ba/F3 et cellules primaires de patients

L'analyse des effets de la stimulation aux différentes cytokines et inhibiteurs de JAKs sur leur signalisation se fait par analyse Western Blot. Les cellules sont d'abord lysées par sonication dans du tampon laemmli 2X. Les protéines sont ensuite dénaturées à 95°C pendant 10 minutes puis séparées selon leur taille sur un gel d'acrylamide, transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées à l'aide d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt.

D'abord, les protéines sont séparées selon leur taille sur un gel de polyacrylamide à 8% en conditions dénaturantes (Tris Glycine-TG) (1X) + SDS (0,1%).

Après la migration, les protéines sont transférées en liquide (TG (1X) + Ethanol (20%)) sur membrane de nitrocellulose. Les épitopes non spécifiques sont saturés grâce à un tampon BSA (5%) et les membranes, incubées avec les anticorps primaires d'intérêt (tels que P-STAT1, STAT1, P-STAT5) (Cell Signaling) une nuit ou avec l'anticorps contre l'actine, qui sert de contrôle de charge à 4°C. Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP-horseradish peroxidase) contre l'espèce dont provient l'anticorps primaires (IgG de lapin ou IgG de souris). Le signal est ensuite révélé avec un réactif chimioluminescent (Pierce ECL substrat ThermoFisher ou ECL FEMTO) (Radiance Plus, Azure biosystems). Les résultats sont analysés à l'aide d'un imageur « ImageQuant LAS 4000 ».

Analyse des effets de la stimulation aux différentes cytokines et inhibiteurs de JAKs sur l'expression des gènes cibles de l'IFN α sur lignées murines Ba/F3 et cellules primaires de patients

Extraction d'ARN

L'ARN est extrait à partir de culots de cellules stimulées 3h à l'IFN α et préalablement resuspendues dans du Trizol (700 μ L). Après 5 min d'incubation dans la glace, les échantillons sont vortexés. On ajoute ensuite une solution de chloroforme (400 μ L) avant de vortexer à nouveau. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm, 20

minutes à 4°C. On obtient alors une phase aqueuse contenant l'ARN qu'on transfère dans un nouveau tube. L'ARN est ensuite précipité dans de l'isopropanol (800µL). Les tubes sont vortexés de nouveau puis centrifugés à 13 000 rpm, 20 minutes à 4°C. On retire alors l'isopropanol puis on lave avec de l'éthanol 70% le culot d'ARN. Après une dernière centrifugation à 13 000 rpm, 20 minutes à 4°C, on retire l'éthanol et on fait sécher les échantillons pour éliminer les résidus d'éthanol avant de les réhydrater dans 30 µL d'H₂O RNase free puis de les stocker à -80°C.

RT-PCR et qPCR

Afin de déterminer l'expression des gènes d'intérêt, on réalise une RT-PCR à partir des ARNs extraits suivi d'une qPCR. La rétrotranscription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est effectuée dans un thermocycleur (**tableau 6**).

A partir de cet ADNc, on réalise une PCR quantitative en temps réel à partir d'un mix contenant un agent intercalant de l'ADN qui fluoresce : le sybergreen (**tableau 7**). Chaque échantillon est analysé en duplicata dans une plaque 96 puits, dans un « 7500 Real Time PCR System » (Applied Biosystem). L'expression des gènes est rapportée à l'expression du gène de ménage HRPT ou PPIA et les résultats ont été analysés avec la méthode du ddCT par rapport au contrôle.

ARN	100 ng/µL
dNTP	500 µM
Random Primer	250 pg/µL
Tampon First Strand Buffer	1X
DTT	10 mM
RNase OUT Recombinant Ribonucleases Inhibitor	2 Unités/µL
SuperScript II Reverse Transcriptase	10 Unités/µL

Tableau 6 : Mix de RT-PCR.
Concentration des différents composés du mix par échantillon pour réaliser la RT-PCR permettant de transcrire l'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

ADNc	1-4 ng/µL
Amorce Sens	400 nM
Amorce Anti-Sens	400 nM
Mastermix contenant la Taq polymerase et l'agent intercalant SYBRgreen (Applied biotechnologies)	50% du volume final

Tableau 7 : Mix de qPCR.
Concentration des différents composés du mix pour un échantillon.

qPCR à haut débit sur cellule unique à partir des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ (en collaboration avec la plateforme de génomique de Gustave Roussy)

Les cellules individuelles ont été isolées en utilisant le système unicellulaire Auto Prep C1 (Fluidigm) avec les puces 5-10 µm. Après la lyse, une reverse transcription a été réalisée suivie d'une pré-amplification utilisant un mélange contenant toutes les amorces humaines d'intérêt selon les instructions de Fluidigm. Les expériences à l'échelle unicellulaire d'expression génique ont ensuite été effectuées en utilisant les puces microfluidiques de qPCR Dynamic Array 192:24 de chez Fluidigm. 2,25 µl d'ADNc amplifié a été mélangé avec 2,5 µl de 2X Ssofast EvaGreen Supermix avec Low ROX (Bio-Rad) et 0,25 µl de tampon de chargement de l'échantillon (Fluidigm) puis mis dans le puits prévu. 100 µM de mélange de toutes les amorces sens et antisens ont été dilués au 1:10^{ème}. 2,5 µl d'amorces diluées ont été mélangés avec 2,5 µl de tampon de charge de chez Fluidigm et insérés individuellement dans chaque puits dédié. Les 192 échantillons et les 24 paires d'amorce ont été chargés dans les microfluidiques de qPCR Dynamic Array 192:24 en utilisant un HX IFC Controller (Fluidigm), puis transférés dans l'appareil Biomark de PCR en temps réel (Fluidigm) en suivant les instructions du fabricant. L'analyse initiale des données du cycle seuil (cycle threshold :Ct) des valeurs a été faite avec le logiciel « Fluidigm Real-time PCR analysis » puis les graphiques ont été réalisés en utilisant le logiciel R dédié à Fluidigm. Les gènes d'intérêt ainsi que leurs amorces sont décrits dans le **tableau 8**. Chaque ADNc a ensuite été repris pour détecter la présence des mutations *JAK2*^{V617F} ou *CALR*^{del52} par qRT-PCR de discrimination allèle spécifique.

Voie IFN			Voie p53		
Gène	Amorce sens	Amorce anti sens	Gène	Amorce sens	Amorce anti sens
ISG15	TTTGCCAGTACAGGAGCTTG	AGCATCTTCACCGTCAGGTC	Puma	CCTGGAGGGTCCTGTACAATCT	CTAATTGGGCTCCATCTCGG
USP18	AGTCCCAGCTGGAAGCTCAG	TATGTGAGCCAGGCACGAT	Noxa1	GGACGTCCTGTGTGAAGTGGA	CACTTGGGGAAGATGCCGAT
IFIT1	GAAAGCCTCAGTCTTGCAGC	CACCATTTGTACACATCTCCACTG	PML	ACATCTTCTGCTCCAACCCC	CTCGGCAGTAGATGCTGGTC
MX1	AGCCCTGCAGAGAGAGAAGA	TTCTCCAGCAGATCCCTGA	Bax	GTGCCTCAGGATGCGTCC	TCCAGTTCGTCCTCCGATG
IFNAR1	ACTCCAAAAGTCGCTGGGTCT	TGTCGACCTCTACTTTTTGAGGA	p21	CGCTAATGGCGGGCTG	CGGTGACAAAAGTCGAAGTTCC
IFNAR2	CAAGGCGAGAGCTGCAAA	GCATTCTGGCTCAAAGCAT	SerpinA1	CCCTGTCTCCTCAGCTTCAG	GACGGCATTGTGATTCACTG
IRF7	CTGGACACTGGTTCAACACC	TCTCTCCAAGGAGCCACTCT			
IRF9	CTTCTTCAAGGCCTGGGCAA	CAGGCGAGTCTTCCAGACAG			
STAT1	AGCACGCTGCCAATGATGT	GCTGTGACAGGAGGTCATGAAA			
SOCS1	GCTGGCCCTTCTGTAGGAT	TGCTGCTGTGGAGACTGCAT			
SOCS2	GAAGTCGCGTTTTATCAGAATGC	ACTGGAGCCTGGACCTTTGA			
SOCS3	CTCTGTGCGAAGACCCTCAAC	CGGCAGCTGGGTGACTTT			
Voie JAK/STAT			Gènes de ménage		
Gène	Amorce sens	Amorce anti sens	Gène	Amorce sens	Amorce anti sens
SOCS1	GCTGGCCCTTCTGTAGGAT	TGCTGCTGTGGAGACTGCAT	Actine B	CCTCGCCTTTGCCGATCC	ATCATCATCCATGGTGAGCTGG
SOCS2	GAAGTCGCGTTTTATCAGAATGC	ACTGGAGCCTGGACCTTTGA	Tubuline A	TCCAGATTGGCAATGCCTG	GGCCATCGGGCTGGAT
SOCS3	CTCTGTGCGAAGACCCTCAAC	CGGCAGCTGGGTGACTTT	HPRT	GGACAGGACTGAACGCTCTTGC	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
Catalase	AGATGCAGCACTGGAAGGAG	AGCTCCAGTGGTCAGGACAT			
p21	CGCTAATGGCGGGCTG	CGGTGACAAAAGTCGAAGTTCC			
STAT1	AGCACGCTGCCAATGATGT	GCTGTGACAGGAGGTCATGAAA			

Tableau 8 : Liste des gènes d'intérêt et de leurs amorces sens et anti-sens pour la qPCR haut débit sur cellule unique.

Résultats

Effets de JAK2^{V617F} sur la signalisation induite par l'IFN α dans les lignées cellulaires Ba/F3-MPL

Afin de confirmer l'effet de JAK2^{V617F} sur la voie de signalisation de l'IFN α observé dans la première partie, nous avons effectué une cinétique de réponse avec une dose constante d'IFN α . Pour cela nous avons traité les cellules à 5000 U/mL d'IFN α pendant 15 min, 30 min, 1h, 3h ou 6h (**Figure 22A**).

Les niveaux de JAK2 sont comparables dans les deux conditions. Concernant les cellules exprimant JAK2^{WT}, la phosphorylation de STAT1 apparaît dès 15 minutes de stimulation, se stabilise jusqu'à 30 minutes puis diminue jusqu'à 6 heures où elle devient presque indétectable. Concernant les cellules exprimant JAK2^{V617F}, l'intensité de phosphorylation est plus forte et la durée du signal est prolongée jusqu'à 1h puis décroît progressivement jusqu'à 6h où elle est encore détectable. Nous remarquons par ailleurs que dans le cas de JAK2^{WT}, STAT1A semble être plus phosphorylée que STAT1B tandis que pour JAK2^{V617F}, les deux isoformes semblent toutes deux fortement phosphorylées.

De manière intrigante, le niveau de STAT1 basal est beaucoup plus important dans les cellules exprimant JAK2^{V617F} et reste beaucoup plus élevé tout au long de la cinétique de traitement à l'IFN α que dans les cellules exprimant JAK2^{WT} (**Figure 22A**). Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'effet dose dans la partie 1.

Afin de connaître l'impact du récepteur MPL sur la réponse à l'IFN α , une expérience d'effet dose a été réalisée et la phosphorylation de STAT1 a été détectée par WB dans les lignées Ba/F3-JAK2^{WT} et Ba/F3-JAK2^{V617F} (dépourvues de MPL) après 15 minutes de traitement (**Figure 22B**). Ainsi, nous observons des effets de l'IFN α tout à fait comparables dans les 2 lignées suggérant que la présence de MPL est requise pour la sensibilisation par JAK2^{V617F} de la voie de l'IFN α .

L'ensemble de ces résultats confirme que JAK2^{V617F} sensibilise à la voie de l'IFN α , notamment par une hausse de STAT1 totale, et requiert MPL pour induire cette sensibilisation.

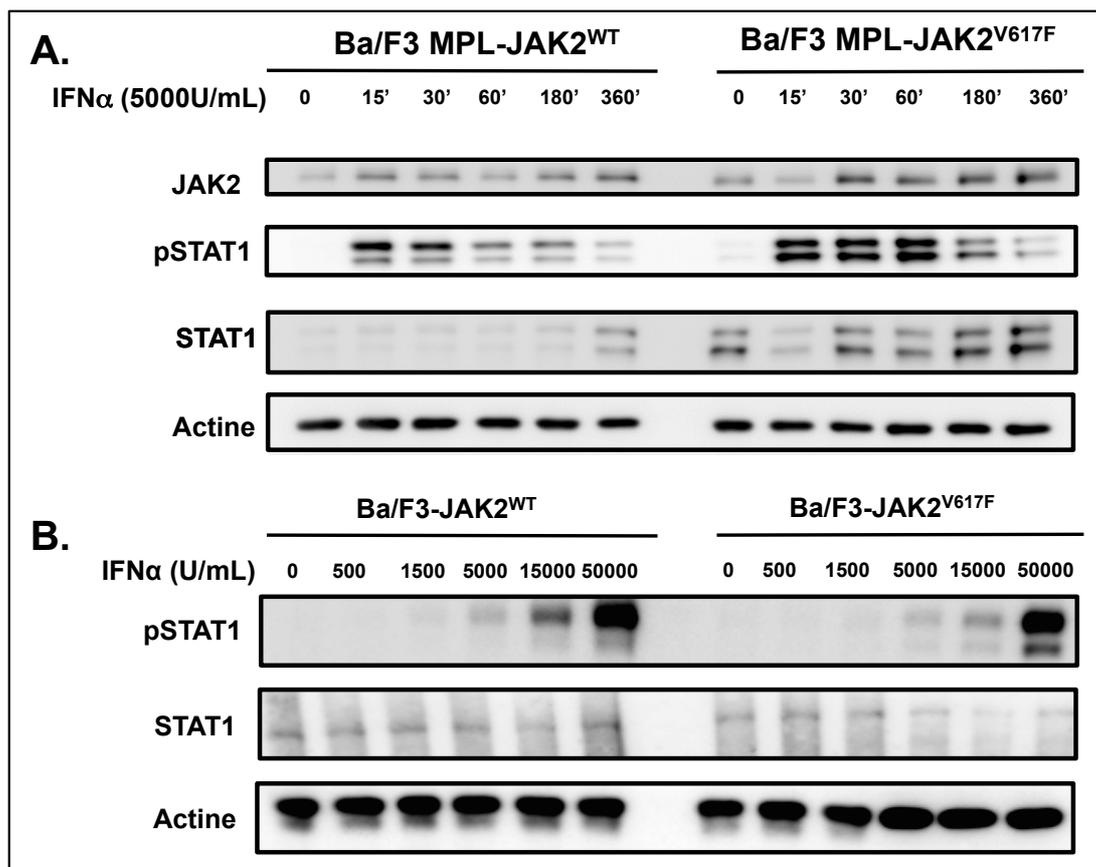


Figure 22. Effets dose et temps de l'IFN α sur sa signalisation dans les lignées Ba/F3-JAK2^{WT} et Ba/F3-JAK2^{V617F} en présence ou en absence de MPL. A. Analyse par WB de la cinétique de réponse à l'IFN α . Après avoir sevré les lignées pendant 6h, les cellules sont stimulées à l'IFN α (5000U/mL) sur des durées croissantes (0, 15min, 30min, 1h, 3h, 6h). Les effets sur la voie de signalisation de l'IFN α sont mesurés par la phosphorylation de STAT1 (n=2). B. Analyse par WB de la réponse dose-dépendante à l'IFN α sur les lignées Ba/F3 JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} dépourvues de MPL. Après avoir sevré les lignées pendant 6h, elles sont stimulées pendant 15 min avec différentes doses d'IFN α (0/500/1500/5000/15 000/50 000U/mL). La phosphorylation de STAT1 est mesurée (n=1).

Effet de deux inhibiteurs pharmacologiques de JAK2 sur les voies de signalisation induites par l'IFN α et la TPO dans des lignées cellulaires Ba/F3-MPL

Afin d'investiguer l'impact de la voie MPL/JAK2/TPO sur la réponse à l'IFN α , nous avons utilisé 2 inhibiteurs de JAK2 de type 1 : le ruxolitinib utilisé en clinique (inhibiteur de JAK1 et JAK2) et le BMS911543, décrit comme plus spécifique de JAK2. Nous avons alors mesuré la phosphorylation de STAT5 pour tester les effets de ces inhibiteurs sur JAK2 et celle de STAT1 pour évaluer leurs effets sur JAK1.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'effet des inhibiteurs sur la voie JAK2/STAT5 activée par JAK2^{V617F} et sur la voie JAK1/STAT5 qui est activée par

l'IFN α . Cette voie peut être induite soit par fixation de la TPO à son récepteur MPL dans un contexte sauvage, soit de manière constitutive par JAK2^{V617F}. Par ailleurs, l'IFN α induit aussi la phosphorylation de STAT5. De fait, nous observons une phosphorylation de STAT5 aussi bien en présence de TPO dans un contexte JAK2^{WT} qu'avec ou sans TPO dans un contexte JAK2^{V617F}. La phosphorylation de STAT5 est aussi observée après stimulation à l'IFN α , celle-ci étant moins forte qu'après stimulation à la TPO dans les cellules JAK2^{WT} mais plus forte qu'après stimulation à la TPO dans les cellules JAK2^{V617F} (**Figure 23A**). De plus, le ruxolitinib inhibe fortement la phosphorylation de STAT5 en contexte JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} après stimulation à la TPO ou à l'IFN α , ce qui dénote bien de son action inhibitrice aussi bien sur JAK1 que sur JAK2. Le BMS911543, quant à lui, inhibe la phosphorylation de STAT5 après stimulation à l'IFN α ou à la TPO dans les cellules JAK2^{V617F} mais n'inhibe que très légèrement sa phosphorylation après stimulation à la TPO ou à l'IFN α dans les cellules JAK2^{WT}, ce qui démontre une meilleure spécificité d'action de l'inhibiteur envers JAK2. L'efficacité de l'inhibition est augmentée d'un facteur 10 avec le ruxolitinib par rapport au BMS911543. Le même type d'effet est observé sur la phosphorylation constitutive de STAT5 en contexte JAK2^{V617F} (**Figure 23A**).

Dans un second temps, nous avons évalué l'effet des inhibiteurs sur la voie JAK1/STAT1 qui est activée par l'IFN α et sur la voie JAK2/STAT1 qui est activée par JAK2^{V617F} à moindre niveau. De fait, nous observons une phosphorylation de STAT1 après stimulation à l'IFN α , à la TPO, ainsi que de façon constitutive en contexte JAK2^{V617F} (**Figure 23A**). Le ruxolitinib, contrairement au BMS911543, inhibe de façon efficace et dose dépendante la phosphorylation de STAT1 en contexte JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} en présence d'IFN α . Nous notons aussi une inhibition de la phosphorylation de STAT1 aussi bien en présence de BMS911543 et de ruxolitinib en contexte JAK2^{V617F} sans IFN α (**Figure 23A**).

Nous avons ensuite testé l'effet des inhibiteurs sur les gènes cibles de l'IFN α médiée par la voie JAK1/STAT1. Pour cela, les cellules Ba/F3-MPL JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} ont été prétraitées avec les inhibiteurs (ruxolitinib ou BMS911543) pendant 3 heures puis stimulées à l'IFN α (500 U/mL) pendant 3 heures et le niveau des transcrits d'ISG15 a été quantifié par qRT-PCR. A cette dose d'IFN α , ISG15 est deux fois plus exprimé dans les cellules JAK2^{V617F} que dans les cellules JAK2^{WT} : JAK2^{V617F} sensibilise donc bien à l'induction des gènes cibles de l'IFN α (**Figure 23B**).

Le prétraitement au BMS911543 ne cause quasiment aucune variation d'ISG15 dans les cellules JAK2^{WT} tandis qu'à faibles doses (10/100nM), il augmente de près de deux fois l'expression d'ISG15 en contexte JAK2^{V617F} (**Figure 23B**).

Le prétraitement au ruxolitinib induit une diminution importante d'ISG15 en contexte JAK2^{WT} de façon dose-réponse ainsi qu'en contexte JAK2^{V617F}. Toutefois, l'expression d'ISG15 est légèrement augmentée en contexte JAK2^{V617F} à faible dose de ruxolitinib (10 nM) (**Figure 23B**).

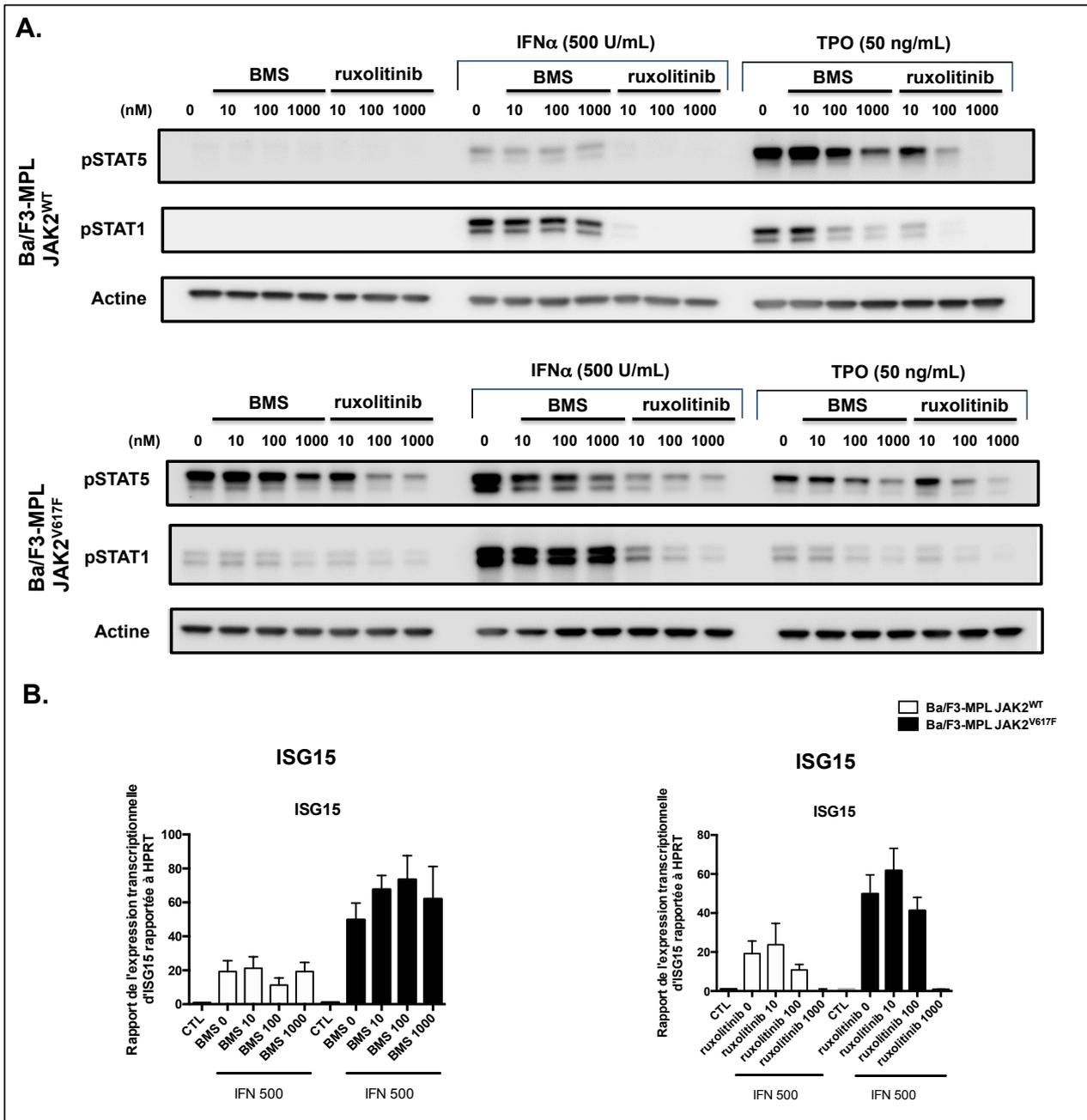


Figure 23. Effets de deux inhibiteurs pharmacologiques de JAK2 sur les voies de signalisation induites par l'IFN α et la TPO dans les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{WT} et MPL-JAK2^{V617F} **A.** Analyse par Western-Blot des effets de deux inhibiteurs de JAK2 (BMS911543 et ruxolitinib) sur la voie de l'IFN α et de TPO/JAK2/STAT. Après sevrage des cellules pendant 6h, elles sont prétraitées par le BMS911543 ou le ruxolitinib à (10/100/1000nM) pendant 3h puis stimulées à l'IFN α (500 U/mL) ou à la TPO (50 ng/mL) pendant 15 min (n=2). Les effets de la stimulation à l'IFN α et à la TPO sont mesurés par la phosphorylation de STAT1 et STAT5 **B.** Analyse par RT-qPCR des effets de deux inhibiteurs de JAK2 (BMS911543 et ruxolitinib) sur la voie de l'IFN α . Après sevrage des cellules pendant 6h, elles sont prétraitées par le BMS911543 (à gauche) et le ruxolitinib (à droite) à (10/100/1000nM) pendant 3h puis stimulées à l'IFN α (500U/mL) pendant 3h. Les effets de la stimulation à l'IFN α sont mesurés par le niveau des transcrits d'ISG15 (n=2).

L'ensemble de ces résultats confirme que le ruxolitinib inhibe à la fois la signalisation médiée par l'IFN α et MPL (JAK1 et JAK2) tandis que le BMS911543 est plus spécifique de la signalisation induite par MPL (JAK2). Ces données suggèrent aussi que JAK2^{V617F} sensibilise la réponse à l'IFN α , notamment par l'induction d'ISG15, et que l'inhibition spécifique de JAK2 par le BMS911543 permet de potentialiser la réponse à l'IFN α en particulier en stimulant ISG15 dans les cellules JAK2^{V617F}, contrairement à l'inhibition de JAK1 et JAK2 médiée par le ruxolitinib.

Effet de l'inhibition de la voie de signalisation médiée par JAK2 par des inhibiteurs pharmacologiques sur la voie de l'IFN α dans les cellules primaires CD34⁺ d'un patient JAK2^{V617F}

Après avoir étudié l'effet de l'inhibition de JAK2 sur la voie de signalisation de l'IFN α dans des lignées Ba/F3-MPL JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F}, nous avons voulu tester son effet sur les cellules progénitrices primaires. Ainsi, nous avons utilisé des progéniteurs CD34⁺ issus d'un patient homozygote JAK2^{V617F} (dont la charge allélique est de 100%) et d'une cytophérèse de donneur contrôle. Les cellules primaires sont mises en culture 5 jours en milieu sans sérum supplémenté en cytokines hématopoïétiques. Les cellules sont ensuite sevrées de l'effet des cytokines pendant 6 heures, puis sont prétraitées par des inhibiteurs de JAK2 (ruxolitinib et BMS911543) pendant 3 heures à 100 et 1000nM avant d'être stimulées à l'IFN α pendant 15 minutes à différentes doses.

Dans les cellules primaires contrôles non traitées, il n'y a pas de phosphorylation basale de STAT1 mais une augmentation de la phosphorylation de STAT1 dose-dépendante après traitement à l'IFN α (10, 100 et 1000U/mL). Le pré-traitement au BMS911543 n'a pas ou peu d'effets sur la phosphorylation de STAT1 par rapport à l'IFN α seul (**Figure 24 A, 24B**). En revanche, le pré-traitement au ruxolitinib (100nM) induit une forte diminution de la phosphorylation de STAT1 par rapport à l'IFN α seul (**Figure 24A**). Ce constat est encore plus flagrant dans le cas d'un pré-traitement au ruxolitinib à 1000nM où l'inhibition de la phosphorylation de STAT1 est quasiment complète par rapport à l'IFN α seul (**Figure 24B**). Ces résultats montrent que le ruxolitinib inhibe la phosphorylation de STAT1 induit par le traitement à l'IFN α quel que soit la dose d'IFN α et la dose d'inhibiteur. Le BMS911543, quant à lui, semble

n'avoir peu ou pas d'effet sur la phosphorylation de STAT1, quelles que soient les doses.

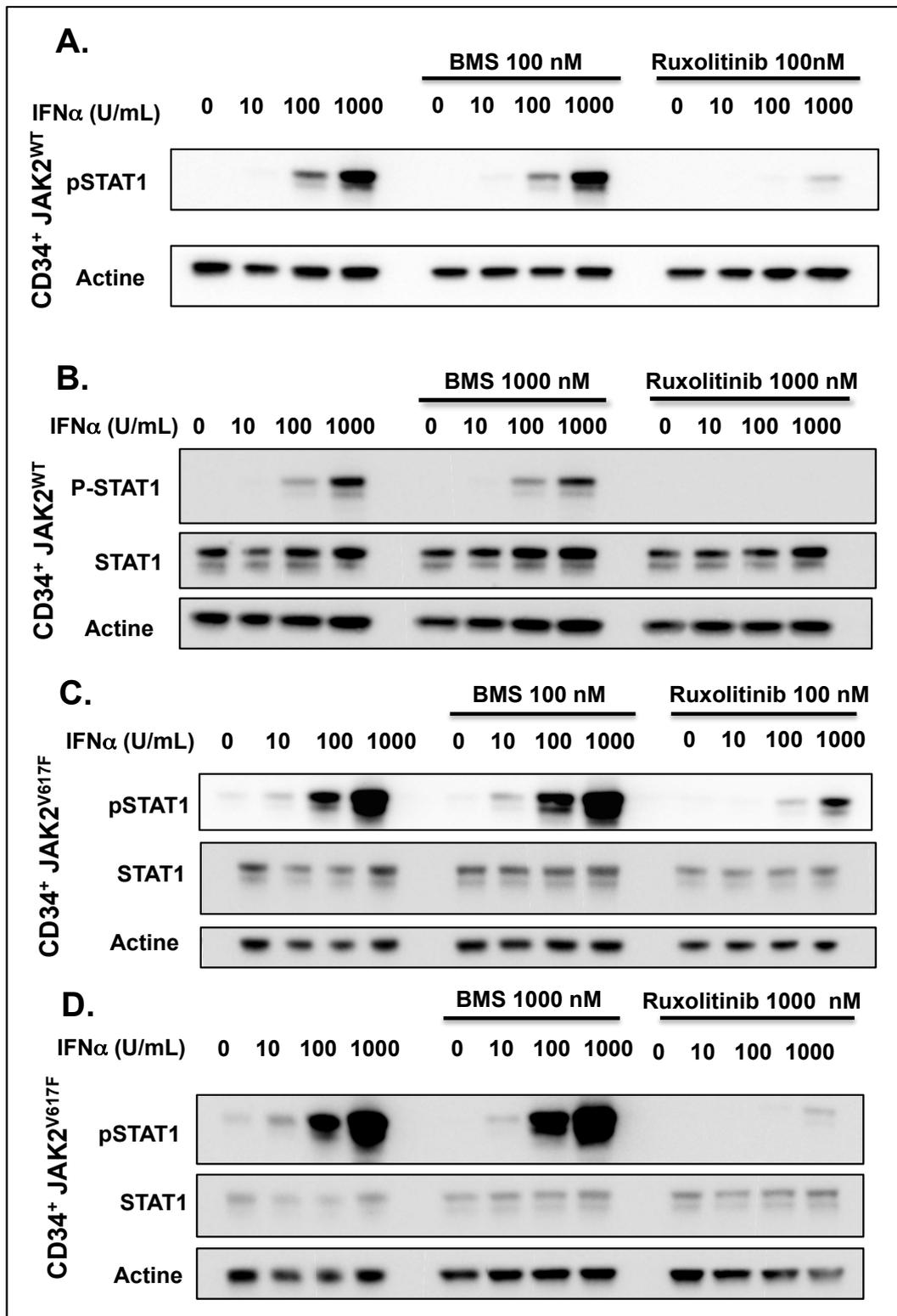


Figure 24. Effets de deux inhibiteurs pharmacologiques de JAK2 sur la voie de signalisation induite par l'IFNα dans des cellules primaires issues de CD34⁺ d'un patient JAK2^{V617F} et d'une cytophérèse de sujet sain. Analyse par Western-Blot des effets de deux inhibiteurs de JAK2 (BMS911543 et ruxolitinib) sur la voie de l'IFNα. Après 5 jours de culture cellulaire des CD34⁺ et après sevrage des cellules pendant 6h, elles sont prétraitées par le BMS911543 ou le ruxolitinib à 100nM (A, C) et 1000nM (B, D) pendant 3h puis stimulées à l'IFNα pendant 15 min à différentes doses (0, 10, 100, 1000 U/mL). Les effets de la stimulation à l'IFNα sont mesurés par la phosphorylation de STAT1 (n=2).

Contrairement aux cellules primaires contrôles, les progéniteurs du patient montrent une phosphorylation basale de STAT1, ce qui est attendu étant donné que JAK2^{V617F} induit une activation constitutive de la voie JAK2/STAT. Après stimulation à l'IFN α , nous observons un effet dose-réponse du traitement sur la phosphorylation de STAT1. Le traitement au BMS911543 seul induit une diminution de la phosphorylation basale de STAT1 probablement due à l'inhibition de JAK2^{V617F}. Enfin, le pré-traitement au BMS911543 suivi de la stimulation à l'IFN α n'induit que peu d'effets par rapport à l'IFN α seul, avec une légère augmentation de la phosphorylation de STAT1 aux doses de 100nM et de 1000nM de BMS911543 et de 100 et 1000U/mL d'IFN α (**Figure 24C, 24D**).

Concernant le traitement au ruxolitinib seul, la phosphorylation basale de STAT1 est inhibée comme dans le cas du BMS911543. En revanche, en pré-traitement de la stimulation à l'IFN α , il inhibe très fortement la phosphorylation de STAT1 et de manière dose-dépendante (100 et 1000nM) (**Figure 24C, 24D**). Globalement, STAT1 ne semble pas varier entre les différentes conditions au sein des progéniteurs du patient ou du contrôle, comparativement à l'actine. Nous ne sommes pas en mesure de dire si le niveau de STAT1 est plus important chez le patient que chez le contrôle, comme observé dans les lignées Ba/F3.

Ces résultats confirment ceux obtenus dans les lignées Ba/F3 et montrent que le pré-traitement au ruxolitinib inhibe la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN α quelle que soit la dose d'IFN α et la dose d'inhibiteur dans les progéniteurs de patients et de contrôles. Néanmoins, il semble que le pré-traitement au BMS911543 impacte peu la phosphorylation de STAT1 induite par l'IFN α voire même l'augmenterait légèrement dans les progéniteurs du patient.

Effet de l'inhibition de la voie de signalisation médiée par JAK2 par des inhibiteurs pharmacologiques sur l'expression de gènes cibles de l'IFN α dans les cellules primaires CD34⁺ d'un patient JAK2^{V617F}

Comme précédemment, les progéniteurs CD34⁺ issus soit d'un patient JAK2^{V617F} soit d'une cytophérèse de donneurs contrôles sont mis en culture 5 jours en milieu sans sérum supplémenté en cytokines hématopoïétiques. Les cellules sont sevrées pendant 6 heures puis prétraitées par les inhibiteurs de JAK2 à 100 et 1000 nM

pendant 3 heures. Enfin, elles sont stimulées pendant 3 heures avec différentes doses d'IFN α , de façon à pouvoir déterminer les effets de l'IFN α sur l'expression de ses gènes cibles. Nous analysons l'expression par qPCR des ISGs : *IFIT1*, *MX1*, *PML* et *STAT2*. Les données sont représentées sous forme d'histogramme montrant le niveau des transcrits rapporté au niveau du gène de ménage *PPIA*. L'expression de ces gènes est comparée à la condition contrôle (cellules non traitées à l'IFN α et aux inhibiteurs).

Concernant *IFIT1*, nous observons une augmentation de son niveau d'expression entre 10 et 100 U/mL d'IFN α qui atteint alors un plateau dans le cas de la cytophérèse et du patient par rapport à la condition contrôle sans traitement : il ne semble pas y avoir de variation entre la condition IFN α 100 et 1000 U/mL.

Lorsque l'on stimule à l'IFN 10 U/mL, le niveau d'expression d'*IFIT1* est 10 fois plus important chez le patient et environ 5 fois plus important chez le contrôle qu'en condition basale. La même tendance est observée avec l'IFN α 100 U/mL. Le niveau d'expression d'*IFIT1* est ainsi plus important chez le patient que chez le contrôle. Le pré-traitement au BMS911543 100 nM n'induit pas de variation d'expression comparativement aux conditions d'IFN α seul (**Figure 25A**), à la fois pour le patient et le contrôle. En revanche, à plus forte concentration de BMS911543 (1000 nM) et d'IFN α (1000 U/mL), le niveau d'expression d'*IFIT1* est environ 3 fois plus important qu'en présence d'IFN α seul chez le patient (**Figure 25A**). A l'inverse, le pré-traitement au BMS911543 n'a que peu d'effet voir un effet opposé sur l'expression d'*IFIT1* à forte dose d'IFN α (1000 U/mL) sur les cellules contrôles (**Figure 25A**). Le pré-traitement au ruxolitinib (100 ou 1000 nM) n'induit pas une augmentation du niveau d'expression d'*IFIT1* comparativement à son niveau basal. Ainsi, le ruxolitinib inhibe totalement le niveau d'expression d'*IFIT1* induit par l'IFN α .

Le profil d'expression de *MX1* est semblable à celui de *IFIT1*. Cependant, nous remarquons que le niveau d'expression de ce gène est plus important par rapport à la condition contrôle que dans le cas d'*IFIT1*. Aussi, nous observons une augmentation plus importante du niveau d'expression de ce gène chez le patient. En effet, à 1000U/mL d'IFN α , elle est 2 fois plus importante chez le patient que chez le contrôle. Le pré-traitement au BMS911543 (100 nM) n'induit pas non plus de variations comparativement aux cellules traitées à l'IFN α seul. Toutefois, chez le patient, les cellules traitées à forte concentration de BMS911543 (1000nM) et d'IFN α

(1000 U/mL) montrent une augmentation drastique du niveau d'expression de *MX1* par rapport au contrôle. *MX1* est alors 5 fois plus exprimé dans cette condition que chez le contrôle et 2 fois plus exprimé qu'en présence d'IFN α seul (**Figure 25B**). Le pré-traitement au ruxolitinib (100nM) inhibe de moitié l'expression de ce gène induit par l'IFN α . A plus forte dose (1000nM), *MX1* n'est pas induit.

Concernant l'expression de *PML*, quelques différences sont observées. Comme précédemment, le niveau d'expression de *PML* augmente de 0 à 100 U/mL d'IFN α mais nous n'observons pas de différence d'expression entre le contrôle et le patient (**Figure 25C**). A 1000 U/mL d'IFN α , le niveau d'expression de *PML* est moins important chez le patient qu'à des doses plus faibles d'IFN α tandis qu'elle continue d'augmenter chez le contrôle. A forte dose de BMS911543 (1000nM), nous avons le même profil d'expression que pour *IFIT1* et *MX1*. En effet, à forte dose d'IFN α (1000 U/mL) et de BMS911543 (1000nM), le niveau d'expression de *PML* augmente par rapport aux autres conditions : l'inhibiteur augmente la réponse à l'IFN α uniquement dans les cellules de patients. Le ruxolitinib inhibe aussi l'expression de ce gène induit par l'IFN α à 100nM ainsi qu'à 1000nM.

Enfin, concernant *STAT2*, nous observons des résultats comparables à *PML* et, bien qu'une augmentation de l'expression du gène est induite par l'IFN α , la variation de cette augmentation aussi bien chez le contrôle que chez le patient est bien moins importante que dans le cas de *IFIT1* et *MX1* (**Figure 25C, 25D**).

L'ensemble de ces résultats montre que l'IFN α induit l'expression des ISGs de manière dose dépendante et de façon plus importante chez le patient que chez le contrôle. Ainsi, JAK2^{V617F} sensibilise à la réponse à l'IFN α via ses gènes cibles dans les cellules primaires de patients. En effet, il est important de noter qu'un traitement préalable au BMS911543 (1000 nM) potentialise la réponse à l'IFN α en terme de niveau d'expression des ISGs, seulement dans les cellules du patient JAK2^{V617F}. Même à faible dose, le ruxolitinib inhibe l'expression des ISGs induite par l'IFN α .

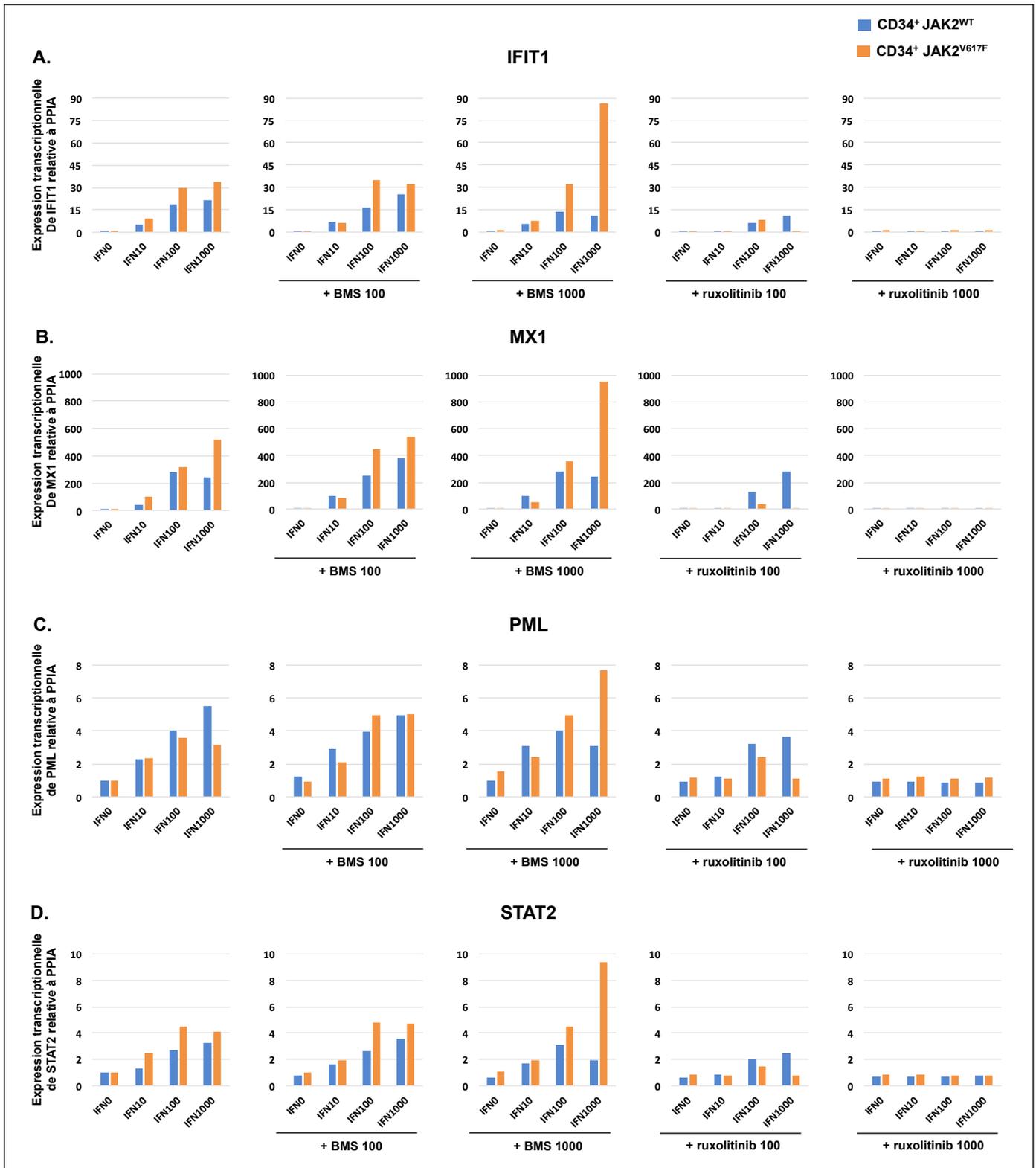


Figure 25. Effets de deux inhibiteurs pharmacologiques de JAK2 sur l'expression des ISGs dans des cellules primaires issues de CD34⁺ d'un patient JAK2^{V617F} et d'une cytophèrese de sujet sain. Analyse par RT-qPCR des effets de deux inhibiteurs de JAK2 (BMS911543 et ruxolitinib) sur l'expression de gènes cibles de l'IFN α : *IFIT1* (A), *MX1* (B), *PML* (C) et *STAT2* (D). Après 5 jours de culture cellulaire des CD34⁺ et après avoir été sevrées pendant 6h, Les cellules primaires de cytophèrese (en bleu) ou du patient (en orange) sont prétraitées par le ruxolitinib et le BMS911543 à 100 ou 1000nM puis stimulées à l'IFN α pendant 3h. Les effets de la stimulation à l'IFN α mesurés par le niveau de transcrits d'ISGs est analysée de façon relative à un gène de ménage (PPIA) et comparée aux contrôles (n=1).

Effets de l'IFN α sur le transcriptome à l'échelon unicellulaire des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ issus de patients PV JAK2^{V617F} traités *in vivo*, en fonction de la présence (MUT) ou non (WT) de la mutation

L'expression génique de différents intervenants de la voie JAK/STAT et de l'IFN α a été étudiée à l'échelon unicellulaire chez quelques patients PV JAK2^{V617F} de la cohorte traitée *in vivo* à l'IFN α , et ce en fonction de la présence ou non de la mutation. La représentation en Violin Plot montre tout d'abord que les progéniteurs des 3 patients expriment le gène de ménage Tubuline A de manière similaire, aussi bien dans les cellules mutées que dans les cellules sauvages, ce qui permet d'avoir un contrôle fiable de l'expérience (**Figure 26A**).

Le patient P3 répond moléculairement au traitement. Globalement, les cellules mutées (P3-MUT) –hétérozygotes ou homozygotes- semblent activer les gènes de ces voies de manière équivalente aux cellules sauvages JAK2 (P3-WT), même si les cellules mutées présentent des niveaux d'expression plus hétérogènes pour ISG15, SOCS2, STAT1 et PML, comparativement aux sauvages (**Figure 26A**).

Les patients P4 et P8 ne répondent pas moléculairement au traitement. Pareillement, les cellules mutées (P4-MUT, P8-MUT) semblent activer les gènes de ces voies de manière équivalente aux cellules sauvages JAK2 (P4-WT, P8-WT). Toutefois, les profils d'expression d'ISG15, SOCS1, SOCS2, STAT1 et PML sont clairement différents entre P8-MUT et P8-WT (**Figure 26A**).

De manière encore plus intéressante, la comparaison des 3 patients entre eux révèle des profils d'expression de SOCS3, MX1, USP18 et ISG15 plus augmentés chez le patient moléculairement répondeur (P3) qu'au sein des non-répondeurs (P4, P8) (**Figure 26A**). Ainsi, une expression forte des gènes cibles de l'IFN α (MX1, USP18 et ISG15) ainsi que des intervenants des voies de signalisation induites par JAK2 et par l'IFN α (SOCS3) semble corrélérer à une meilleure réponse moléculaire au traitement. Ces résultats sont confirmés par l'analyse PCA où le patient P3 –et plus particulièrement les cellules P3-WT- ségrège de manière indépendante des deux autres patients (**Figure 26B**).

L'expression des différents gènes de la voie p53 a ensuite été investiguée à l'échelon unicellulaire parmi ces patients PV JAK2^{V617F} de la cohorte traitée *in vivo* à l'IFN α , et ce, toujours en fonction de la présence ou non de la mutation.

Globalement, en représentation Violin Plot, les cellules mutées (P3-MUT, P4-MUT, P8-MUT) –hétérozygotes ou homozygotes- semblent activer les gènes de la voie p53 de manière équivalente aux cellules sauvages JAK2 (P3-WT, P4-WT, P8-WT). Toutefois, les P8-MUT présentent des niveaux d'expression plus hétérogènes pour NOXA1, Bax et Puma, comparativement aux sauvages, sans forcément être plus exprimés (**Figure 27A**).

La comparaison des 3 patients entre eux révèle des profils d'expression génique de la voie p53 similaires, qu'ils soient moléculairement répondeurs ou pas (**Figure 27A**). Ainsi, la voie p53 ne semble pas crucialement impliquée dans la réponse moléculaire au traitement. Ces résultats sont confirmés par l'analyse en PCA Plot où les patients P3, P4 et P8 ne ségrègent pas (**Figure 27B**).

Effets de l'IFN α sur le transcriptome à l'échelon unicellulaire des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ issus de patients TE JAK2^{V617F} et CALR^{mut} traités *in vivo*, en fonction de la présence (MUT) ou non (WT) de la mutation

L'expression génique de différents intervenants de la voie JAK/STAT et de l'IFN α a ensuite été comparée à l'échelon unicellulaire chez un patient TE JAK2^{V617F} (P7) et un patient TE CALR^{mut} (P8) de la cohorte traitée *in vivo* à l'IFN α , et ce en fonction de la présence ou non de la mutation. La représentation en Violin Plot permet d'observer tout d'abord que les progéniteurs des 2 patients expriment de manière globalement similaire le gène de ménage Tubuline A (**Figure 28A**).

Les patients P6 et P7 répondent tous deux moléculairement au traitement. Globalement, les cellules hétérozygotes du patient 6 (P6-MUT) semblent activer les gènes de ces voies de manière équivalente aux cellules sauvages CALR (P6-WT), même si les mutées présentent des niveaux d'expression plus hétérogènes pour STAT1, SOCS2, SOCS3 et USP18, comparativement aux sauvages (**Figure 28A**).

De la même manière, les cellules mutées du patient 7 (P7-MUT) semblent activer les gènes de ces voies de manière équivalente aux cellules sauvages JAK2 (P7-WT), bien que les profils d'expression de SOCS2, PML et IRF9 soient clairement plus hétérogènes dans les P7-MUT (**Figure 28A**). Il est aussi important de noter que l'expression de MX1 est beaucoup plus faible dans les cellules mutées que dans les cellules sauvages chez ce patient.

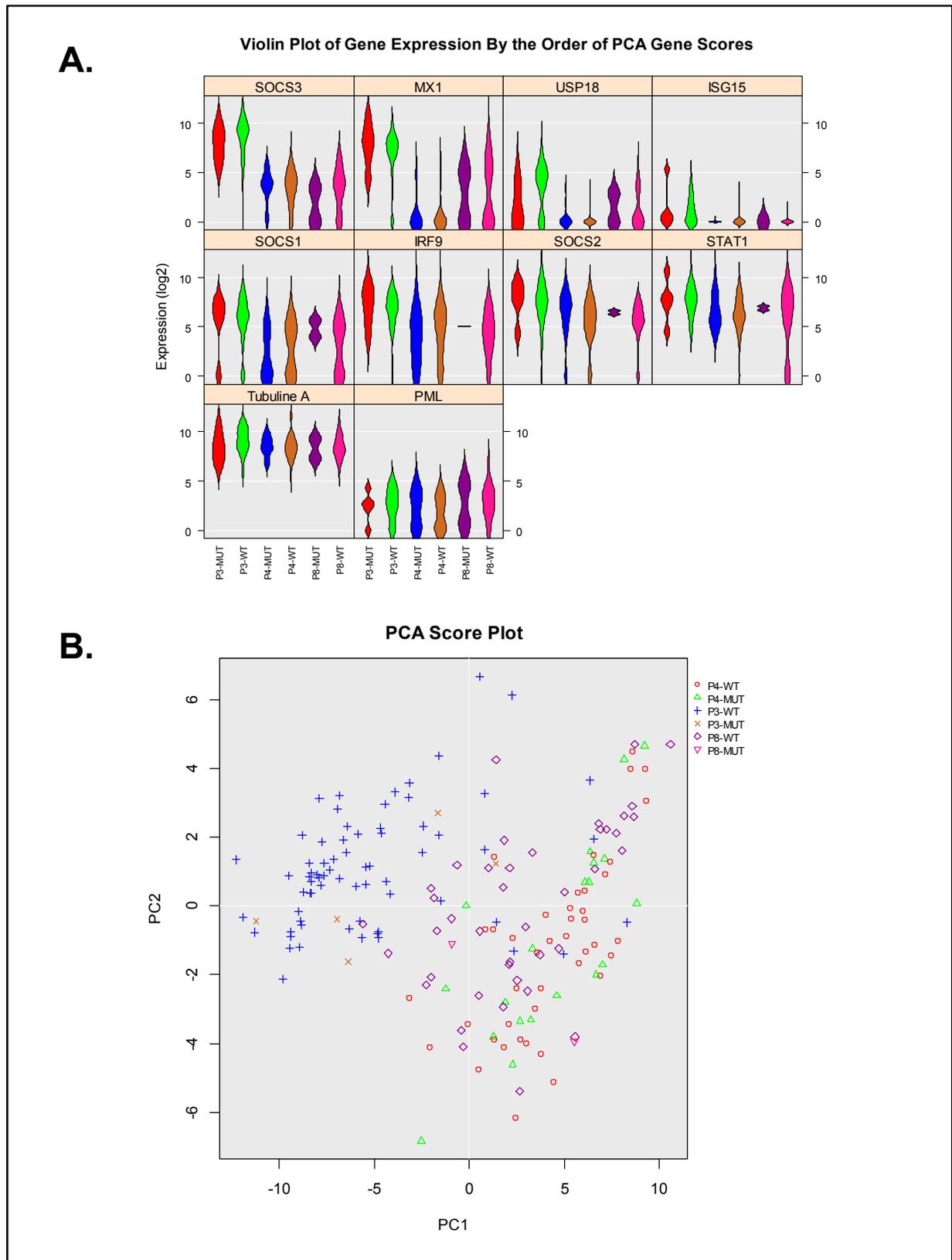


Figure 26. Effets de l'IFN α sur le transcriptome à l'échelon unicellulaire des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ issus de patients PV JAK2^{V617F} traités *in vivo*, en fonction de la présence (MUT) ou non (WT) de la mutation. (A) Violin Plot représentant les niveaux d'expression de gènes relatifs aux voies JAK/STAT et IFN α sur 3 patients (P3, P4, P8). Il a été décrit que P3 répondait moléculairement au traitement tandis que P4 et P8 n'y répondaient pas. (B) Représentation des mêmes résultats sous forme de PCA (Analyse en Composantes Principales) Plot.

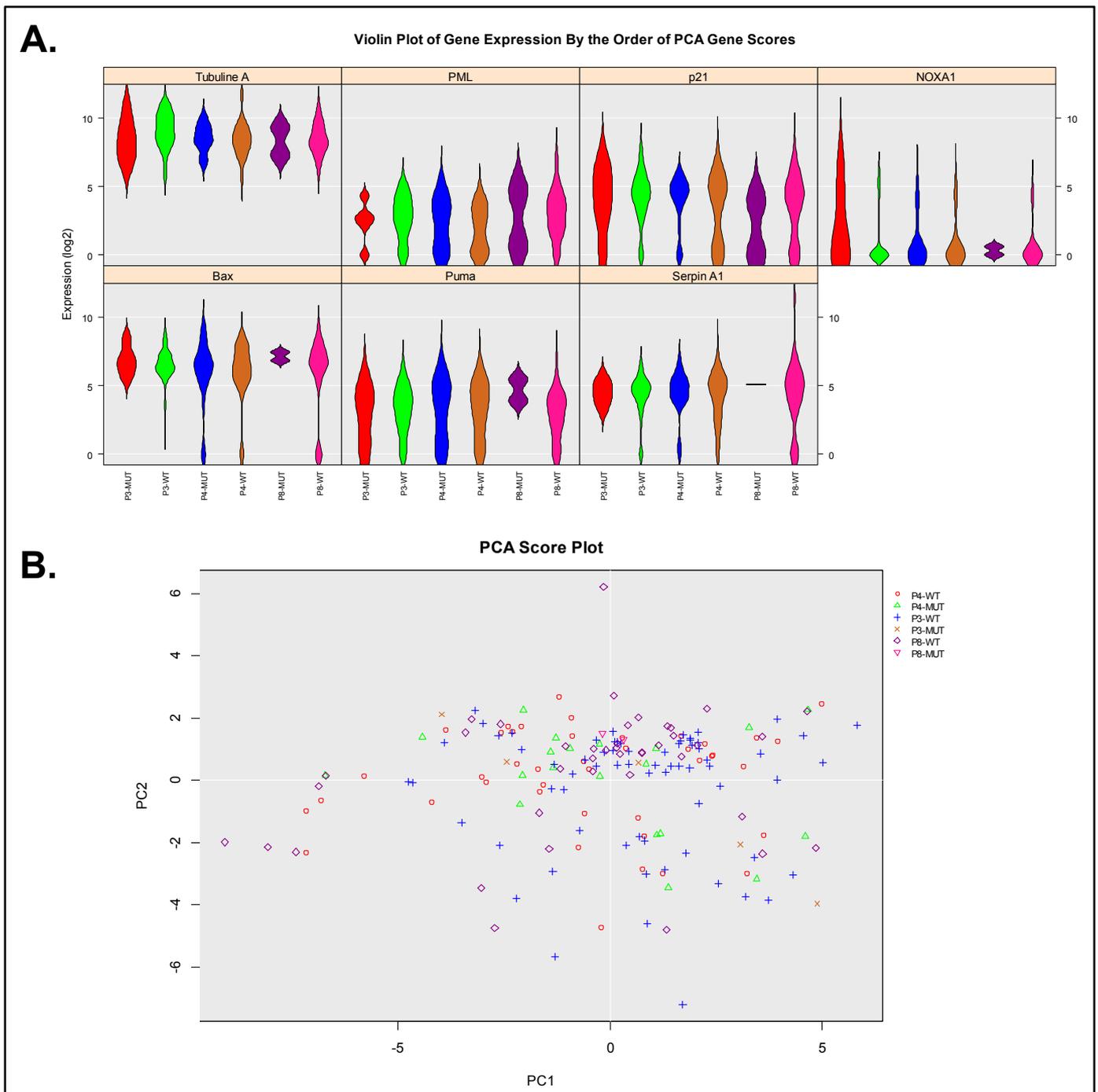


Figure 27. Effets de l'IFN α sur le transcriptome à l'échelon unicellulaire des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ issus de patients PV JAK2^{V617F} traités *in vivo*, en fonction de la présence (MUT) ou non (WT) de la mutation. (A) Violin Plot représentant les niveaux d'expression de gènes relatifs à la voie p53 sur 3 patients (P3, P4, P8). Il a été décrit que P3 répondait moléculairement au traitement tandis que P4 et P8 n'y répondaient pas. (B) Représentation des mêmes résultats sous forme de PCA (Analyse en Composantes Principales) Plot.

La comparaison des 2 patients entre eux révèle des profils d'expression génique similaires (**Figure 28A**). Ainsi, le type de mutation –JAK2^{V617F} ou CALR^{mut}- ne semble pas influencer sur l'expression des gènes cibles de l'IFN α ou sur les intervenants des voies de signalisation induites par JAK2 ou l'IFN α . Ces résultats sont confirmés par l'analyse PCA où les patients P6 et P7 ne ségrègent pas (**Figure 28B**).

L'expression des différents gènes de la voie p53 a ensuite été investiguée à l'échelon unicellulaire parmi ces patients TE JAK2^{V617F} et CALR^{mut} de la cohorte traitée *in vivo* à l'IFN α , et ce, toujours en fonction de la présence ou non de l'une ou de l'autre des mutations.

Globalement, en représentation Violin Plot, les cellules mutées (P6-MUT, P7-MUT) – globalement hétérozygotes- semblent activer les gènes de la voie p53 de manière équivalente aux cellules sauvages JAK2 (P6-WT, P7-WT). Toutefois, les P7-MUT présentent des niveaux d'expression plus hétérogènes pour NOXA1, Bax et Puma, comparativement aux sauvages, sans forcément être plus exprimés. Aussi, p21 semble globalement sous-exprimé dans les P7-MUT comparativement aux P7-WT (**Figure 29A**). La comparaison des 2 patients entre eux révèle des profils d'expression génique de la voie p53 similaires, ce qui est cohérent dans le sens où ils sont tous deux répondeurs moléculaires (**Figure 29A**). Ainsi, la voie p53 ne semble pas crucialement impliquée dans la réponse moléculaire au traitement. Ces résultats sont confirmés par l'analyse en PCA Plot où les patients P6 et P7 ne ségrègent pas (**Figure 29B**).

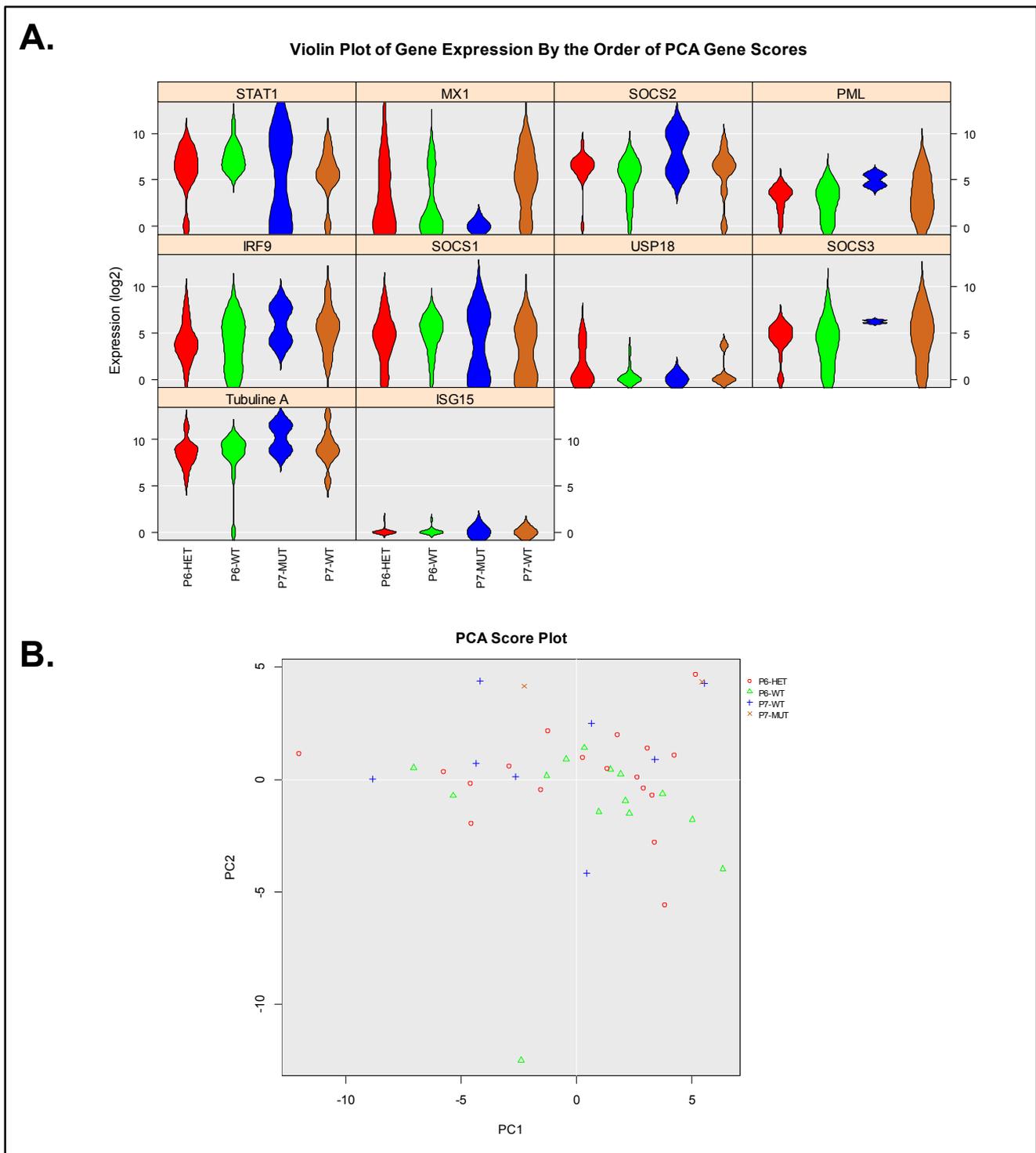


Figure 28. Effets de l'IFN α sur le transcriptome à l'échelon unicellulaire des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ issus de patients TE JAK2^{V617F} (P7) ou CALR^{mut} (P6) traités *in vivo*, en fonction de la présence (MUT) ou non (WT) de la mutation. (A) Violin Plot représentant les niveaux d'expression de gènes relatifs aux voies JAK/STAT et IFN α . Il a été décrit que P6 et P7 répondaient moléculairement au traitement. (B) Représentation des mêmes résultats sous forme de PCA (Analyse en Composantes Principales) Plot.

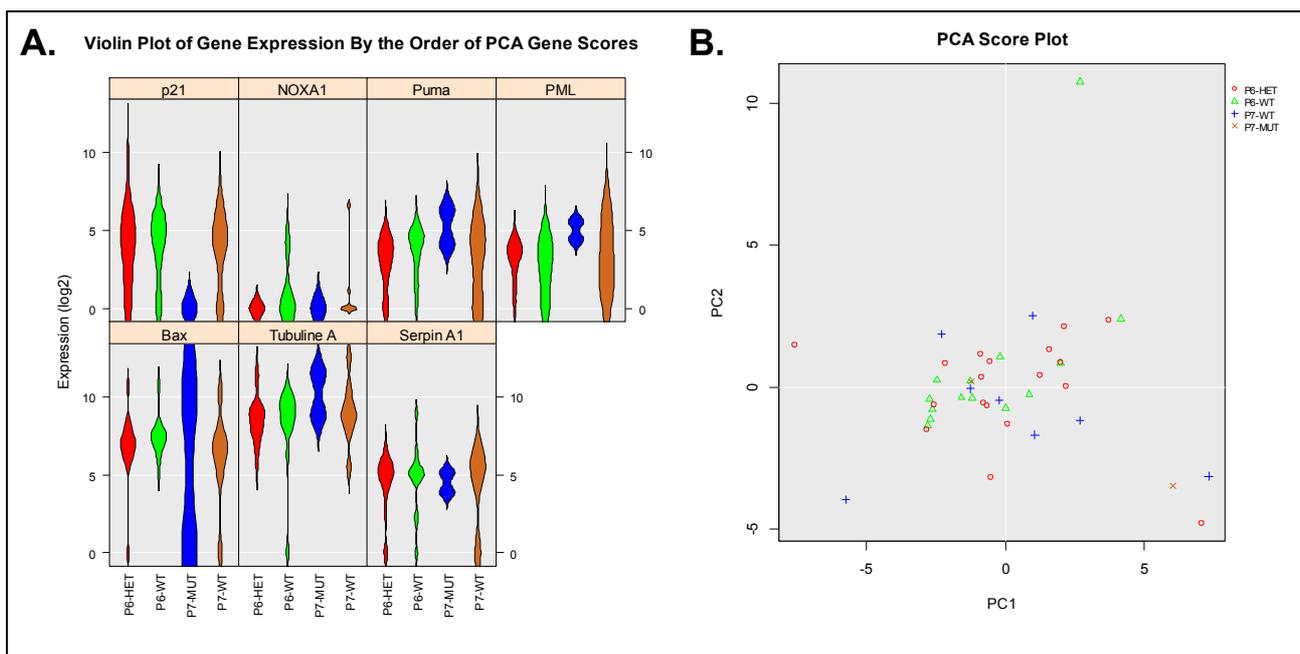


Figure 29. Effets de l'IFN α sur le transcriptome à l'échelon unicellulaire des progéniteurs CD34⁺CD38⁺ issus de patients TE JAK2^{V617F} (P7) ou CALR^{mut} (P6) traités *in vivo*, en fonction de la présence (MUT) ou non (WT) de la mutation. (A) Violin Plot représentant les niveaux d'expression de gènes relatifs à la voie p53. Il a été décrit que P6 et P7 répondaient moléculairement au traitement. (B) Représentation des mêmes résultats sous forme de PCA (Analyse en Composantes Principales) Plot.

*L'ensemble de ces résultats à l'échelon unicellulaire suggère que l'expression des gènes cibles de l'IFN α est très peu différente entre les cellules mutées ou sauvages quel que soit le génotype (CALR^{mut} ou JAK2^{V617F}). De plus, bien que très préliminaires, ces données indiquent une activation de la voie de l'IFN α plus importante chez le patient PV répondeur que chez les patients PV non répondeurs, ce qui peut suggérer une intensité de la voie de signalisation plus importante chez les patients répondeurs. Les causes de ces différences d'activation restent à investiguer (différences de fond génétique sur IFNAR, ou expression variable des régulateurs négatifs). Des cellules de sujets sains devront aussi être analysées ainsi que des cellules de patients traités *in vitro* à l'IFN α afin d'évaluer plus précisément ces différences de réponse. En effet, l'un des problèmes majeurs dans ce type d'expérience réside en la difficulté de connaître la durée exacte depuis la dernière exposition des patients à l'IFN α au moment du prélèvement sanguin.*

Partie 3. Etude des interrelations entre la signalisation induite par JAK2 et celle de l'IFN α dans le modèle *in vivo* de souris KI JAK2^{V617F}

Cette partie a été réalisée au sein du groupe de Jean-Luc Villeval par **Valérie Edmond** (Ingénieure) et **Tracy Dagher** (Thèse) afin d'étudier l'effet de la combinaison IFN α ±BMS dans le modèle de souris KI JAK2^{V617F}. Ces expériences ont été réalisées en parallèle des miennes dans les lignées et les cellules primaires de patients et des réunions communes, auxquelles j'ai participé, ont été effectuées.

Matériels et méthodes

Modèle préclinique chimérique Knock-in (KI) JAK2^{V617F} – Wild type (WT)

Génération du modèle KI JAK2^{V617F}/GFP

Le modèle KI JAK2^{V617F}/GFP est obtenu en 3 étapes de croisements (**Figure 30**) :

1. Les souris KI JAK2^{V617F} LoxP^{+/-} sont croisées avec des souris Ubi-GFP^{+/+} pour générer des souris KI JAK2^{V617F} LoxP^{+/-}/Ubi-GFP^{+/-},
2. Les souris KI JAK2^{V617F} LoxP^{+/-}/Ubi-GFP^{+/-} sont croisées avec des souris Ubi-GFP^{+/+} pour générer des souris KI JAK2^{V617F} LoxP^{+/-}/Ubi-GFP^{+/+},
3. Les souris KI JAK2^{V617F} LoxP^{+/-}/Ubi-GFP^{+/+} sont croisées avec des souris vav-Cre^{+/+} pour générer des souris KI JAK2^{V617F} LoxP^{+/-}/Ubi-GFP^{+/-}/vav-Cre^{+/-}.

Ainsi, les souris obtenues à l'issue du 3^{ème} croisement expriment JAK2^{V617F}. Elles expriment aussi la GFP de manière ubiquitaire, ce qui permet le suivi des cellules JAK2^{V617F} par détection de fluorescence analysable en cytométrie de flux.

Greffe chimérique KI JAK2^{V617F}/GFP – WT

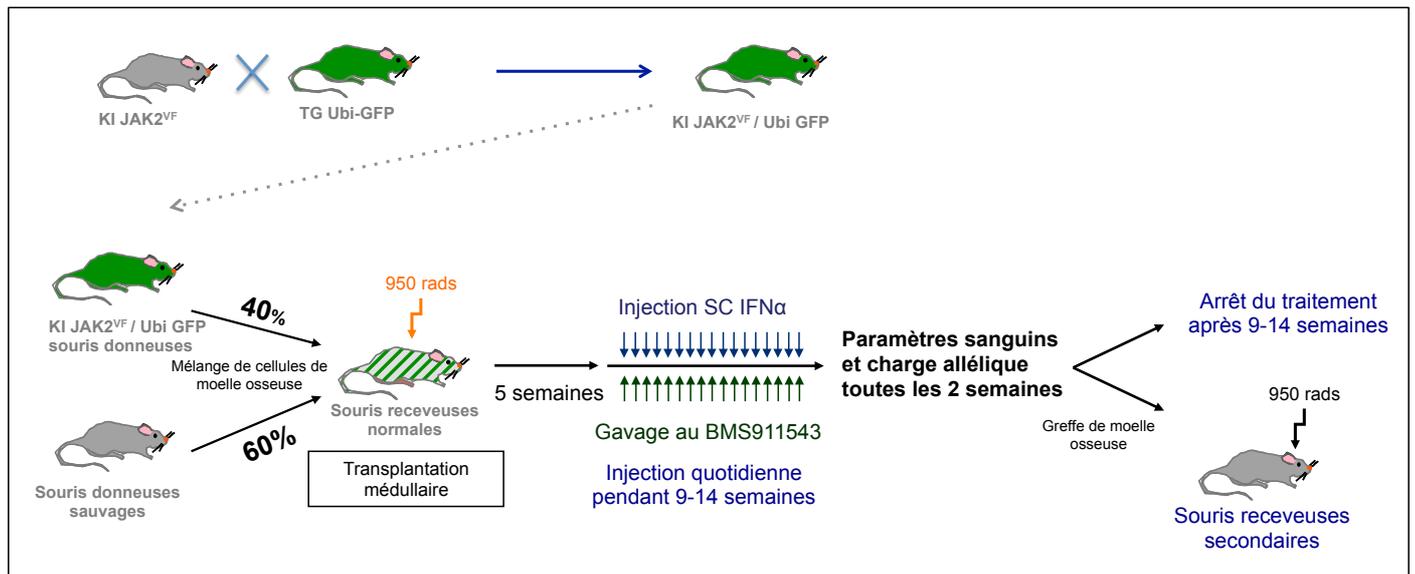


Figure 30. Schéma des différentes étapes de l'étude *in vivo*.

Des souris receveuses WT sont irradiées à une dose létale de 9.5 Gy à l'aide d'un irradiateur à rayon X (modèle XRAD320) puis transplantées avec 3×10^6 cellules de moelle osseuse provenant à 40% des souris KI JAK2^{V617F}/GFP et à 60% de souris sauvages WT par voie rétro-orbitale (**Figure 30**). 5 semaines après la greffe, les souris receveuses présentent une polyglobulie de Vaquez mimant la pathologie humaine.

Préparation et administration des molécules de traitement

La solution d'IFN α à administrer d'une concentration de $3 \cdot 10^5$ IU/mL est préparée en diluant un volume de la solution mère d'IFN α murin à $1 \cdot 10^7$ IU/mL (Miltenyi Biotec) dans du PBS 1X (Phosphate Buffer Saline). L'injection se fait de manière sous-cutanée avec un volume d'administration de 0,1 mL pour une quantité de 30 000 UI /souris.

Le BMS-911543 sous forme de poudre est resuspendu dans le véhicule (20% citrate/80% PEG400) de façon à obtenir une concentration de 3 mg/mL. Le traitement se fait *per os* avec un volume d'administration de 0,2 mL pour une dose de 30 mpk (mg/kg), soit 0,6 mg pour une souris de 20 g.

Traitement quotidien des souris KI JAK2^{V617F}/GFP – WT

Cinq semaines post-greffe, les souris chimériques KI JAK2^{V617F}/GFP - WT sont randomisées sur la base de la charge allélique JAK2^{V617F}/GFP dans les granulocytes et 4 groupes de souris sont organisés avec une charge allélique moyenne dans les granulocytes qui ne présente pas de différence significative entre les groupes :

- 1- Véhicule (n=7)
- 2- IFN α 30 000 IU/souris par jour (n=7)
- 3- BMS 30 mpk par jour (n=8)
- 4- IFN α 30 000 IU/souris + BMS 30 mpk par jour (n=8)

Analyse des paramètres hématologiques et de la charge allélique JAK2^{V617F}/GFP dans les cellules matures du sang

Toutes les 2 semaines durant la période du traitement, les souris sont anesthésiées par voie gazeuse (Isoflurane Belamont, Piramal Healthcare UK) et 100 μ l de sang de chaque souris sont prélevés en sub-mandibulaire sur des tubes EDTA pour étudier la numération sanguine ainsi que la charge allélique. Les paramètres sanguins comme l'hématocrite, le nombre de globules rouges, de plaquettes et de globules blancs sont déterminés en utilisant un analyseur sanguin (MS9, Melet Schloessing, Cergy Pontoise, France). Pour l'étude de la charge allélique dans les globules rouges, 0.7 μ l de sang total sont ajoutés à 100 μ l de PBS supplémenté avec 1% d'albumine sérique bovine (BSA). Le reste du sang est transféré dans un tube à hémolyse contenant 4 mL de tampon ACK (Chlorure d'ammonium NH₄Cl 0,155 M, Bicarbonate de Potassium KHCO₃ 0,01 M et Disodium EDTA dihydrate EDTA Na₂.2H₂O 10⁻⁴ M) qui permet de lyser uniquement les globules rouges. Le tube est homogénéisé doucement par retournement et centrifugé 5 min à 300 g, le surnageant est éliminé et le culot de cellules nucléées est lavé dans 5 mL de PBS et centrifugé 5 min à 300 g. Le surnageant est éliminé, 3 μ l de Fc blocker anti-souris CD16/CD32 mAB (Ozyme BioLegend) sont ajoutés pour bloquer les sites aspécifiques, les tubes sont vortexés puis incubés 10-15 min à température ambiante. 1 mL de PBS-BSA 1% est ajouté puis la suspension cellulaire est divisée en deux tubes, l'un pour l'étude de la charge allélique dans les plaquettes et l'autre pour l'étude de la charge allélique dans

le reste des cellules nucléées. Les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 1400 rpm puis le surnageant est éliminé. Des mélanges d'anticorps couplés à différents fluorochromes (Ozyme BioLegend) sont préparés au 1/200^e dans du PBS-BSA 1% selon le **Tableau 9**.

Tube	Anticorps	Fluorochrome	Cellules marquées
1	Gr1 (Ly6-C/G)	PE Cyanine 7	Granuleux
	CD11b	APC Cyanine 7	Granuleux
	B220	PE	Lymphocytes B
	CD3e	APC	Lymphocytes T
2	Ter 119	APC	Globules rouges
3	CD42d	APC	Plaquettes

Tableau 9. Liste des mix d'anticorps couplés à différents fluorochromes et leurs différentes cibles cellulaires.

100 µl du mix sont ajoutés dans le tube adéquat et après une heure d'incubation à l'obscurité, 1 mL de PBS-BSA 1% est ajouté, les tubes centrifugés 5 min à 1400 rpm puis le surnageant éliminé. Un volume adéquat de PBS est ajouté aux tubes avant leur passage au cytomètre en flux (Canto II, BD Biosciences). Ainsi la charge allélique JAK2^{V617F} est évaluée sur le pourcentage de cellules GFP+ dans les cellules matures du sang.

Sacrifice des souris, marquage des cellules immatures de la moelle osseuse et de la rate et greffes secondaires

A la fin de la période de traitement, une partie des souris est euthanasiée par inhalation de CO₂ puis disséquée pour récupérer les fémurs et les tibias des pattes postérieures et la rate qui sont placés dans une boîte de pétri contenant du milieu de culture DMEM contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 1% Pénicilline/Streptomycine et 1% Glutamine. Les os sont « flushés » des deux côtés avec du milieu de culture dans un tube à hémolyse à l'aide d'une seringue de 1 mL et d'une aiguille de 23G. Les amas cellulaires sont dissociés par des va-et-vient avec la seringue et l'aiguille de 23G. La rate est pesée puis broyée manuellement avec un dispositif pour le broyage dans 4 mL de milieu de culture puis filtrée à 70 µm. 20 µl de suspension de cellules de moelle osseuse ou de rate sont dilués dans 180 µl de

PBS 1X et passés sur l'analyseur hématologique Sysmex KX21N afin d'évaluer la concentration cellulaire. 30 à 40.10⁶ cellules de moelle osseuse et 60.10⁶ cellules de rate sont prélevées dans de nouveaux tubes. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 1200 rpm et le surnageant est éliminé par retournement. Le culot cellulaire est repris dans du tampon « cell-staining » (PBS 3% SVF) pour 15.10⁶ cellules/mL additionné au Fc blocker anti-souris CD16/CD32 mAB (Ozyme Biolegend) à 0,3 µl/10⁶ cellules et incubé pendant 10 à 15 min sur glace. Les tubes sont centrifugés pendant 5 min à 1200 rpm et le surnageant est éliminé par retournement. Une étape de déplétion des cellules matures que sont les lymphocytes B et T, les globules rouges, les monocytes et les granulocytes, est ensuite effectuée. Le cocktail de déplétion des cellules hématopoïétiques matures (Lin⁺) est composé des anticorps anti-souris biotinylés suivants : Ly-6G and Ly-6C (Gr-1), CD11b (Integrin αM chain), CD45R/B220, CD3e (CD3 ε chain), TER-119/Erythroid Cells (Ly-76). Ce cocktail est ajouté à 1,5 µl/10⁶ cellules et le tube est incubé pendant 20 à 30 min sur glace. Les cellules sont lavées dans 10 volumes de tampon « Imag » (PBS 0,5% BSA, 2mM EDTA) puis centrifugées pendant 5 min à 1200 rpm puis le surnageant est éliminé par retournement. Les particules magnétiques de streptavidine (BD IMag™) sont vortexées vigoureusement puis ajoutées aux cellules à raison de 3 à 5 µl/10⁶ cellules. Les tubes sont vortexés vigoureusement et incubés 30 min sous agitation en chambre froide. 1 mL de tampon « Imag » est ensuite ajouté et après agitation, les tubes contenant les billes sont déposés sur un bloc aimanté, laissés quelques min. La fraction enrichie en cellules Lin⁻ est prélevée à l'aide d'une pipette tout en gardant le tube sur le bloc aimanté, et transférée dans un tube FACS préalablement posé sur glace. Ces étapes sont répétées 2 fois pour un volume total de cellules Lin⁻ récupéré de 3 mL. Les tubes sont centrifugés pendant 7 min à 1400 rpm puis le surnageant est éliminé.

Un mélange d'anticorps couplés à différents fluorochromes (Ozyme BioLegend) est préparé dans du PBS-BSA 1% selon le **tableau 10**.

Anticorps	Fluorochrome	populations marquées	Volume / 10 ⁶ cellules
Gr-1	APC	Cellules matures (sélection négative)	1.25 µl
CD11b	“		1.25 µl
CD3e	“		5 µl
B220	“		1.25 µl
Ter119	“		5 µl
c-Kit	PE	LSK	0.5 µl
Sca-1	PE-Cy7		1.25 µl
CD48	APC Cy7	SLAM	1.25 µl
CD150	BV421		5 µl

Tableau 10. Liste des mix d'anticorps couplés à différents fluorochromes et leurs différentes cibles cellulaires.

200 µl du mélange est ajouté dans chaque tube et après une heure d'incubation à l'obscurité les cellules sont lavées dans 1 mL de PBS-BSA 1%, les tubes centrifugés 5 min à 1400 rpm puis le surnageant éliminé. Un volume adéquat de PBS est ajouté aux tubes et les cellules sont de nouveau filtrées à 70 µm avant leur passage au cytomètre en flux (Canto II). Ainsi la charge allélique JAK2^{V617F} est évaluée sur le pourcentage de cellules GFP+ dans les différents compartiments immatures de la moelle osseuse et de la rate.

Pour la greffe secondaire, 6x10⁶ cellules de moelle osseuse sont conservées dans 400 µl de milieu DMEM et sont greffées dans 2 souris receveuses WT préalablement irradiées à 9,5 Gy. A partir de la 4^{ème} semaine post-greffe, ces souris receveuses sont étudiées pour leur numération sanguine et leur charge allélique dans les cellules matures du sang toutes les 2 semaines (**Figure 30**).

Les souris qui n'ont pas été sacrifiées sont laissées sans traitement et leurs paramètres sanguins ainsi que leur charge allélique dans les cellules matures sont évalués toutes les 2 semaines (**Figure 30**) afin d'étudier les phénomènes de rechute.

Résultats

Réponse hématologique des souris chimériques $JAK2^{V617F}/GFP$ - WT sous traitement à l'IFN α et/ou au BMS911543

Les souris greffées en compétition avec 40% de cellules de la moelle provenant de souris KI $JAK2^{V617F}$ et 60% de cellules de la moelle provenant de souris $JAK2^{WT}$ présentent une leucocytose et une polyglobulie importante (taux d'hématocrite > 80%) après 5 semaines de greffe. En terme de réponse hématologique, le BMS911543 ou l'IFN α permettent une diminution du compte leucocytaire, et la combinaison des deux thérapies accentue cette diminution (**Figure 31A**). L'IFN α administré seul a un effet thrombopéniant qui est contrecarré lorsqu'il est administré en combinaison avec le BMS911543 (**Figure 31B**). Concernant les paramètres liés aux globules rouges, la combinaison BMS911543 et IFN α induit une diminution significative des taux d'hématocrite et d'hémoglobine, pour retrouver des valeurs quasiment normales, comparativement aux molécules administrées seules qui n'induisent qu'une baisse très modérée des comptes érythrocytaires (**Figure 31C, D**). Toutefois, après arrêt du traitement, les souris ayant reçu la combinaison montrent des taux d'hématocrite et d'hémoglobine repartant à la hausse, ce qui indique des phénomènes de rechute.

Réponse moléculaire des souris chimériques $JAK2^{V617F}/GFP$ - WT sous traitement à l'IFN α et/ou au BMS 911543

La réponse moléculaire est évaluée en mesurant le taux de cellules GFP⁺ dans chaque compartiment cellulaire du sang. Aussi bien dans les granuleux (GR1⁺/CD11b⁺) que dans les plaquettes (CD41⁺CD42⁺), le traitement au BMS911543 ou à l'IFN α seul permet une diminution modérée de la charge allélique de $JAK2^{V617F}$ et la combinaison des deux drogues permet d'amplifier cet effet (**Figure 32A, B**). Dans les érythrocytes (CD71⁺Ter119⁺), l'effet de la combinaison des deux traitements sur la charge allélique est bien meilleur que l'effet de chaque traitement seul même si cet effet est différé du fait de la durée de vie plus longue des érythrocytes (**Figure 32C, D**). Toutefois, après arrêt du traitement, la charge allélique réaugmente dans tous les compartiments cellulaire des souris ayant reçu la combinaison.

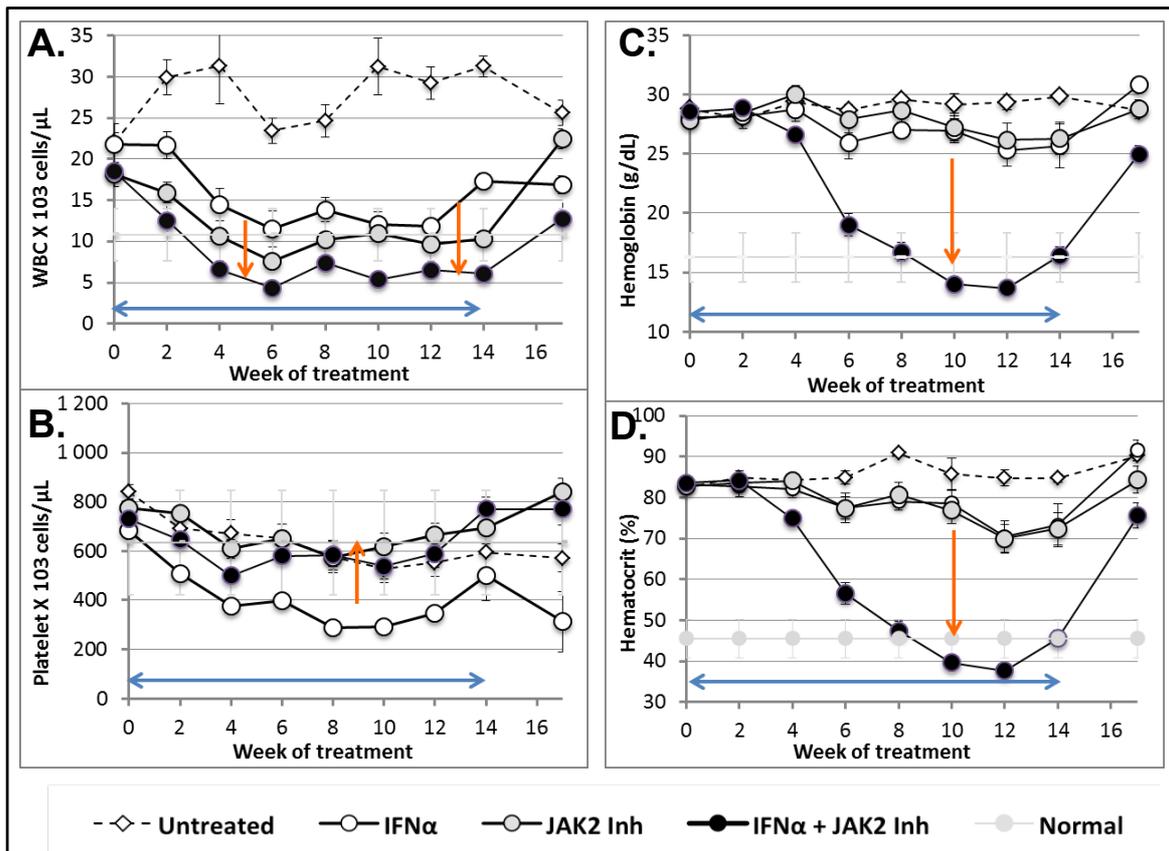


Figure 31. Réponse hématologique des souris chimériques JAK2^{V617F}/GFP – WT sous traitement à l'IFN α et au BMS911543. La greffe primaire est réalisée en compétition avec 40% de cellules JAK2^{V617F}/GFP et 60% de cellules WT et les souris greffées sont traitées à l'IFN α associé ou non au BMS911543. (A) Compte des globules blancs (B) Compte des plaquettes (C) Taux d'hémoglobine (D) Taux d'hématocrite.

Réponse moléculaire dans les compartiments progéniteurs de la moelle osseuse et de la rate des souris chimériques JAK2^{V617F}/GFP - WT après traitement à l'IFN α et/ou au BMS911543 et greffes secondaires

A l'issue de la période de traitement, une partie des souris de chaque groupe est sacrifiée afin d'évaluer la charge allélique de JAK2^{V617F} dans les compartiments les plus immatures de la moelle osseuse et de la rate (1), et de regreffer ces cellules de moelle osseuse dans des souris secondaires afin d'évaluer l'effet des traitements sur les cellules souches JAK2^{V617F} initiatrices de la maladie (2).

Globalement, on constate que les souris ayant reçu la combinaison d'IFN α et de BMS911543 présentent une réduction significative de la charge allélique JAK2^{V617F} dans presque tous les compartiments progéniteurs (LK, LSK, SLAM) comparativement aux souris non traitées et même aux souris ayant reçu l'une ou l'autre des molécules, et ce aussi bien dans la moelle osseuse que dans la rate (**Figure 33A, B**). Concernant la cellularité splénique, les traitements à l'IFN α et au

BMS911543, seuls ou en combinaison, ont un effet majeur sur la réduction de la splénomégalie mais la combinaison n'a pas d'effet additionnel sur la diminution du volume de la rate (**Figure 33C**).

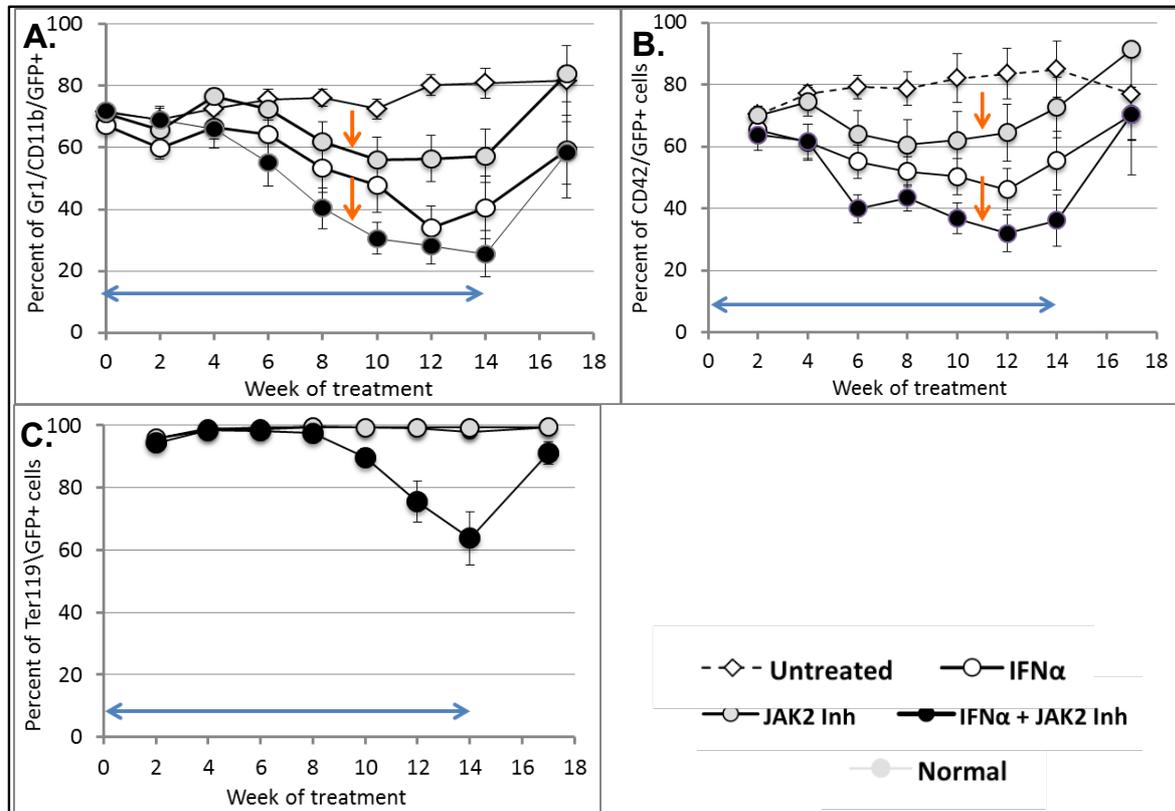


Figure 32. Réponse moléculaire des souris chimériques JAK2^{V617F}/GFP – WT sous traitement à l'IFNα et/ou au BMS911543. La greffe primaire est réalisée en compétition avec 40% de cellules JAK2^{V617F}/GFP et 60% de cellules WT et les souris greffées sont traitées à l'IFNα associé ou non au BMS911543. (A) Pourcentage de granulocytes (Gr1+/cd11b+) JAK2^{V617F} GFP+ (B) Pourcentage de plaquettes (CD42) JAK2^{V617F} GFP+ (C) Pourcentage d'érythrocytes (Ter119) JAK2^{V617F} GFP+.

Les souris secondaires ont été suivies d'un point de vue hématologique et moléculaire. 11 semaines après transplantation, nous constatons une réponse hématologique partielle en condition d'IFNα seul et quasiment pas d'effet du BMS911543 seul. De façon intéressante, seule la combinaison IFNα – BMS911543 permet de restaurer des paramètres sanguins normaux aussi bien en terme de compte leucocytaire que de taux d'hématocrite (**Figure 34A, B**). De plus, la charge allélique JAK2^{V617F} est quasiment indétectable sous combinaison des deux traitements alors qu'elle n'est que seulement réduite en condition d'IFNα ou de BMS911543 seuls et ce, aussi bien dans les granuleux que dans les plaquettes (**Figure 34C, D**). Ces résultats montrent que la combinaison thérapeutique IFNα et BMS911543 permet un ciblage préférentiel des CSH JAK2^{V617F}.

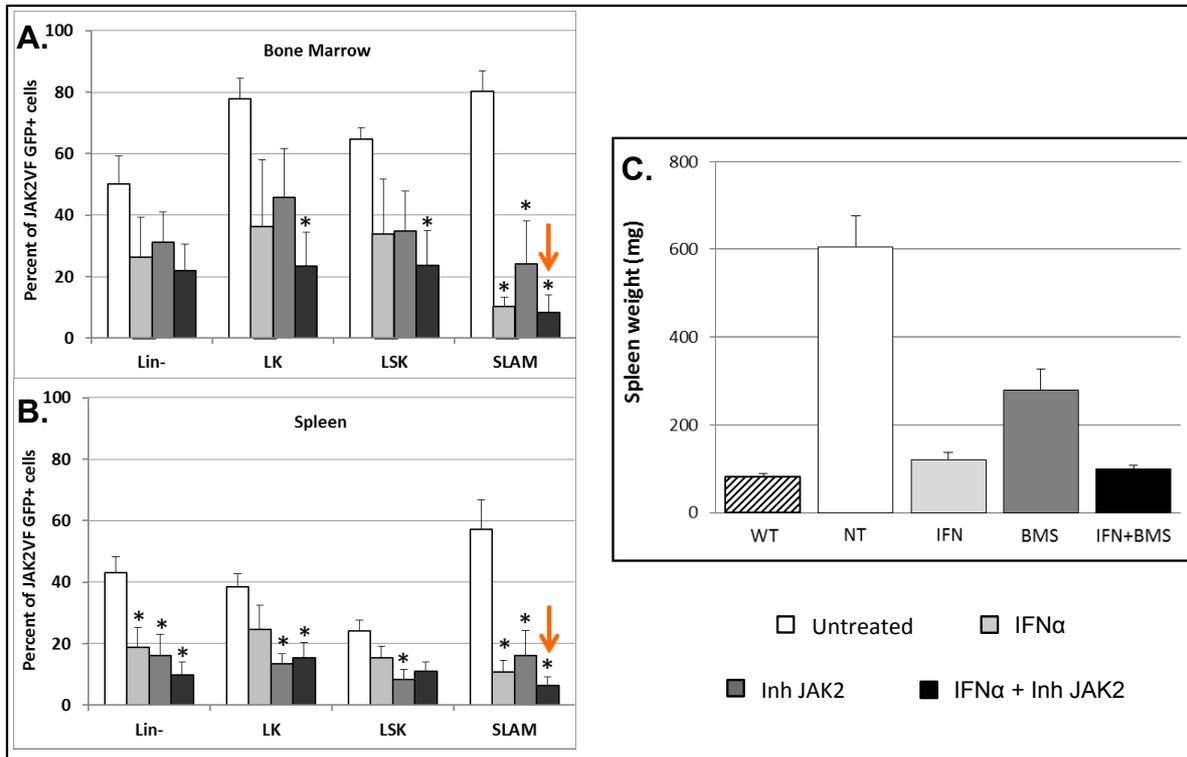


Figure 33. Réponse moléculaire dans les compartiments progéniteurs des souris chimériques JAK2^{V617F}/GFP – WT sous traitement à l'IFN α et/ou au BMS911543 et effet sur la splénomégalie. Après 14 semaines de traitement, la charge allélique JAK2^{V617F} est étudiée dans les compartiments plus immatures (LK, LSK, SLAM) de la moelle osseuse (A) et de la rate (B). (C) Poids des rates.

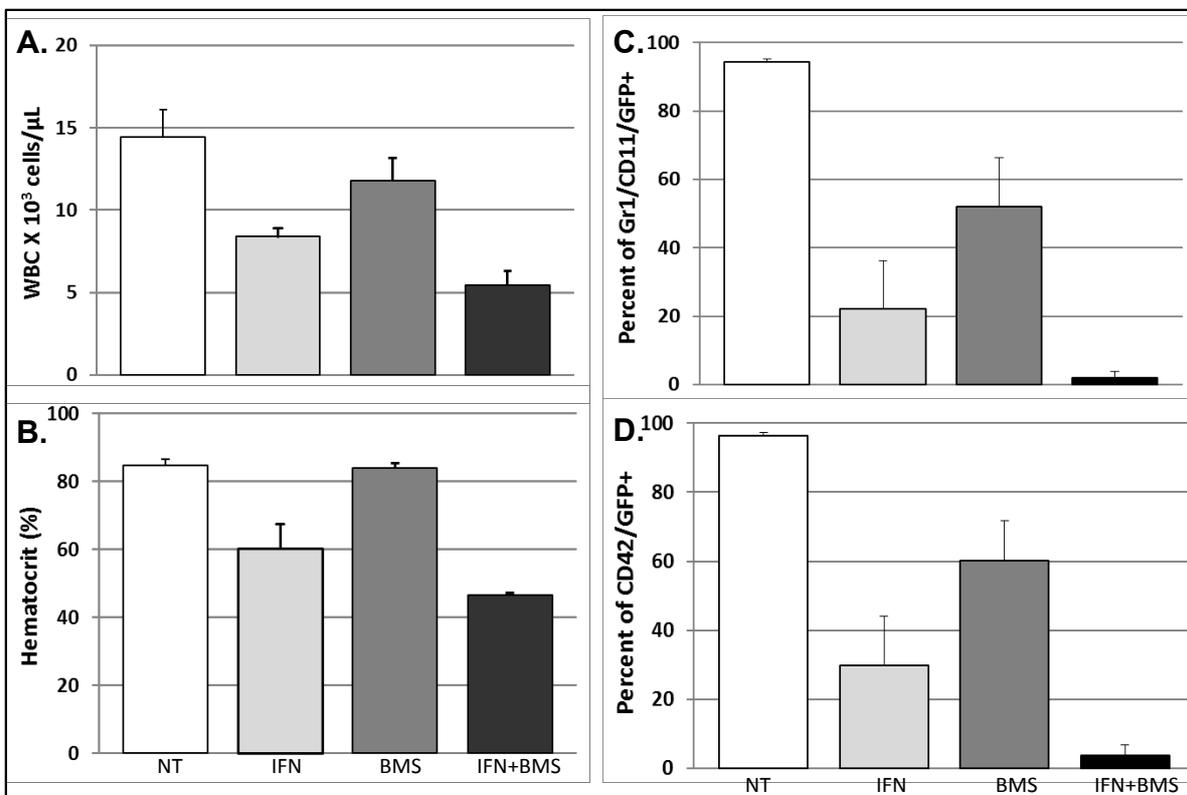


Figure 34. Réponse hématologique et moléculaire dans les greffes secondaires provenant de souris chimériques JAK2^{V617F}/GFP - WT préalablement sous traitement à l'IFN α et/ou au BMS911543. La greffe secondaire permet de transplanter les cellules de la moelle osseuse des souris chimériques JAK2^{V617F}/GFP - WT précédemment traitées à l'IFN α et/ou au BMS911543 et la charge allélique est évaluée par le pourcentage de cellules GFP⁺ après 11 semaines de transplantation. (A) Compte des globules blancs (B) Taux d'hématocrite (C) Pourcentage de granulocytes (Gr1+/cd11b+) JAK2^{V617F} GFP⁺ (B) Pourcentage de plaquettes (CD42) JAK2^{V617F} GFP⁺.

Au final, l'ensemble de ces résultats suggère que le BMS911543 a un effet synergique sur l'IFN α , ce qui permet d'induire une réponse hématologique partielle voire complète, et pourrait mener à terme à une rémission moléculaire complète de la maladie.

Discussion

L'ensemble de ces résultats permet d'établir un impact différentiel de l'IFN α à la fois dans les différents compartiments hématopoïétiques humains, dans les cellules homozygotes et hétérozygotes pour JAK2^{V617F} mais aussi dans les contextes JAK2^{V617F} et CALR^{mut}. Enfin, la sensibilisation à l'IFN α des cellules exprimant JAK2^{V617F} qui n'est pas observée dans les cellules exprimant CALR^{mut} suggère une certaine implication de la protéine JAK2^{V617F} dans la signalisation médiée par l'IFN α et soupçonne des mécanismes d'action thérapeutiques moléculaires voire cellulaires différents de l'IFN α entre les différents contextes mutationnels.

Potentiel thérapeutique de l'IFN α dans le traitement des NMP

JAK2^{V617F}, CALR^{mut} et MPL^{W515X} sont des mutations motrices présentes dans les LT-CSH des patients NMP et sont suffisantes pour l'initiation et le maintien de la maladie au cours de la vie du patient. L'élimination de ces cellules mutées est cruciale à la rémission de la maladie. Ainsi, les inhibiteurs de JAK2 ont démontré en clinique des vertus palliatives dans la résolution du phénotype des NMP mais aucun, pour l'heure, n'a montré de rémissions moléculaires vraiment prometteuses et de réelle éradication de la maladie.

Grâce à ses propriétés antiprolifératives et myélosuppressives, l'IFN α est utilisé depuis près de 30 ans pour traiter les hémopathies malignes par un mécanisme complexe. Il a largement été utilisé dans les LMC -avant la découverte des inhibiteurs de *BCR-ABL*- et permettait déjà la rémission moléculaire complète chez quelques patients, même après l'arrêt du traitement, suggérant alors un ciblage de la cellule souche leucémique. Plus récemment dans les PV/TE, ses réponses prometteuses, tant d'un point hématologique, qu'histologique et moléculaire, ont fait de l'IFN α une thérapie puissante capable d'éradiquer la maladie au niveau CSH chez la souris et justifient l'investigation approfondie de son mécanisme d'action et de son potentiel à guérir les NMP^{347,348,355}.

Par le biais d'une cohorte longitudinale de patients traités *in vivo* à l'IFN α et pour médiane de temps de traitement de 33 mois, nous avons analysé les réponses

hématologique et moléculaire de ces patients TE/PV/MF présentant les mutations JAK2^{V617F}, CALR^{mut} ou MPL^{W515X}.

Tout d'abord, la réponse hématologique claire au sein des trois maladies (74% dans la cohorte JAK2^{V617F} et 69% dans la cohorte CALR^{mut}) qui consiste en un rétablissement de l'hématocrite, de la leucocytose et de la numération plaquettaire avait déjà été observée dans des études cliniques plus anciennes^{340,347,348,349,353}. Il est important de noter que, dans notre étude, les rares cas de non-répondeurs hématologiques JAK2^{V617F} présentent tous un phénotype de PV. La thrombocytopénie induite chez certains patients traités peut être attribuée aux effets antiprolifératifs de l'IFN α sur la mégacaryopoïèse et notamment à ses effets inhibiteurs sur la formation proplaquettaire^{148,317}.

Ciblage différentiel des cellules matures par l'IFN α

Nous avons par la suite investigué la réponse moléculaire dans les cellules matures des patients JAK2^{V617F} et CALR^{mut}. Après une médiane de 33 mois de temps de traitement, 40% des patients JAK2^{V617F} sont répondeurs moléculaires dont 8% sont en rémission moléculaire complète dans les granuleux. Cette proportion de répondeurs est aussi légèrement augmentée après un suivi médian de 51 mois, respectivement 56% et 12%. Toutefois, ces taux de réponse sont inférieurs à ceux observés dans les études précédentes : 59% de répondeurs moléculaires après une médiane de 12 mois de temps de traitement, et 72% parmi les PV JAK2^{V617F} dans une première étude³⁴⁷ ; 60% de répondeurs moléculaires dans les PV et 67% dans les TE après une médiane de 42 mois de temps de traitement dans une seconde étude³⁴⁸. La sous-représentation des répondeurs moléculaires dans notre étude peut s'expliquer par le fait qu'elle inclut une diversité de phénotypes (TE/PV/MF), bien que les PV soient les plus représentées. La dose d'IFN α ainsi que le type de cellules purifiées sont aussi des critères très importants. En effet, les études sur sang total réalisées dans les études précédentes surestiment la réponse moléculaire en intégrant aussi les compartiments lymphoïdes dans le calcul de la charge allélique, tandis que notre étude se focalise sur les granuleux. De plus, les traitements antérieurs n'ont pas fait l'objet de critères d'exclusion dans notre étude, et les patients étaient généralement plus âgés et connaissaient des durées de traitement plus variables que dans l'étude de Kiladjian, *et al.*³⁴⁷. Enfin, le type de mutations

associées, comme *TET2*, peut s'avérer être un facteur délétère³⁵¹ bien que ce soit peu probable dans cette étude puisque seulement 8% des patients suivis (2/25) possèdent la mutation additionnelle. On peut toutefois penser que les patients arborant des mutations associées échappent au traitement et permettent de maintenir une charge allélique élevée, ou au contraire peuvent faciliter la réponse à l'IFN α et diminuer encore plus drastiquement cette même charge allélique.

Après une médiane de 33 mois de temps de traitement, 25% des TE CALR^{mut} sont répondeurs moléculaires dans les granuleux dont seulement 8% sont en RMC. Ces résultats sont toujours inférieurs à ceux préalablement observés (64% de répondeurs moléculaires dont 6% de RMC)³⁵² mais similaires à ceux de Kjaer, *et al.*³⁵³. Ces divergences entre les études peuvent être dues aux mêmes facteurs que pour les patients JAK2^{V617F}. Il est important de noter que, d'après la littérature³⁵² et d'après nos résultats, un paramètre crucial de réponse moléculaire au traitement chez les patients CALR^{mut} s'avère être le nombre de mutations associées, contrairement aux patients JAK2^{V617F}. En effet, dans notre étude, des mutations associées sont retrouvées chez 30% des patients CALR^{mut} et il semble y avoir une corrélation entre la réponse moléculaire et l'absence de mutations associées, bien que le nombre de patients soit réduit. Enfin, nous observons une tendance vers une efficacité de traitement plus importante en présence de la mutation JAK2^{V617F} qu'en présence de celle de CALR^{mut} dans les cellules matures. Ainsi, la protéine JAK2^{V617F} elle-même, et non pas l'activation de la voie JAK2/STAT à proprement parler, semble être impliquée dans la réponse à l'IFN α .

Ciblage différentiel des CPSH par l'IFN α

Etant donné que les NMP sont des hémopathies clonales et acquises au niveau des CSH^{78,80}, que l'IFN α cible à la fois les cellules souches JAK2^{V617F} dans un modèle murin chimérique KI JAK2^{V617F}^{324,325} et les CPSH humaines *in vitro*³²⁰, nous avons étudié l'impact de l'IFN α sur les CPSH de la cohorte. De manière très intéressante, nous retrouvons toujours une réponse moléculaire plus importante dans les CPSH JAK2^{V617F} que dans les cellules matures. La réponse moléculaire la plus forte est retrouvée dans les compartiments hématopoïétiques les plus immatures, avec 38% de patients en rémission moléculaire complète dans les progéniteurs enrichis en CSH. Ces résultats soutiennent l'argument d'un ciblage plus rapide et efficace des

CPSH comparativement aux cellules matures, d'autant qu'un modèle similaire a déjà été observé dans les LMC traitées à l'IFN α et présentant la mutation *BCR-ABL*. Dans le but d'évaluer l'effet de l'IFN α , nous avons constaté que la charge allélique de JAK2^{V617F} diminuait drastiquement au cours du traitement pour atteindre un plateau au terme de 800 jours de traitement aussi bien dans les CPSH que dans les cellules matures JAK2^{V617F}, sans que la mutation disparaisse, témoignant de la nécessité d'une longue période de traitement pour acquérir une RMC, comme suggéré dans d'autres études cliniques^{347,348}.

L'IFN α traite la maladie en ciblant préférentiellement les clones JAK2^{V617F} au niveau CSH. En effet, le différentiel de la moyenne des charges alléliques avant et après traitement de JAK2^{V617F} est fortement plus élevé dans les cellules matures que dans les CPSH. Aussi, la moyenne de la charge allélique de JAK2^{V617F} au cours du traitement se stabilise entre 20 à 25% dans les cellules matures tandis qu'elle est presque indétectable dans les CPSH. Cette observation intrigante peut être la conséquence soit du fort avantage prolifératif de JAK2^{V617F} durant la différenciation hématopoïétique⁸⁰, soit de la génération de la plupart des granuleux à partir d'un GMP JAK2^{V617F} à la demi-vie et à l'auto-renouvellement très longs. Cette dernière hypothèse est peu probable dans le sens où les mêmes résultats sont constatés dans le compartiment plaquettaire.

En parallèle, nous avons évalué l'efficacité du traitement dans les CPSH CALR^{mut} et n'avons retrouvé aucune différence significative en terme de réponse moléculaire comparativement aux granuleux : l'IFN α affecte les différents compartiments hématopoïétiques de manière équivalente chez les patients CALR^{mut}. Deux hypothèses peuvent alors être émises pour expliquer ce phénomène : l'IFN α agit bien sur les CSH mais CALR^{mut} induit un effet plus réduit que la mutation JAK2^{V617F} sur la différenciation granulocytaire et donc sur la production des granuleux mutés. L'autre hypothèse met en avant les caractéristiques immunogéniques de CALR^{mut} qui pourrait médier la réponse immunologique au traitement à l'IFN α de sorte que toutes les cellules et donc tous les compartiments hématopoïétiques soient ciblés de la même manière.

Enfin, nous observons un ciblage plus important des progéniteurs immatures et enrichis en CSH des patients JAK2^{V617F} que des CPSH des patients CALR^{mut} par

l'IFN α , ce qui suggère que JAK2^{V617F} a bien un effet spécifique sur la réponse à l'IFN α , comparativement à JAK2^{WT}, dans le cas des patients CALR^{mut}.

Globalement, ces résultats suggèrent que l'IFN α induit une réponse hématologique majeure quelle que soit la mutation et une réponse moléculaire plus importante pour la mutation JAK2^{V617F}. Toutefois, cette réponse nette n'exclut pas la potentielle présence d'un clone malin résiduel quiescent dans la moelle osseuse. En effet, même certaines RMC qui se maintiennent longtemps après l'arrêt du traitement peuvent présenter une minorité de clones malins dans leur moelle osseuse³⁵¹. L'étude des différents compartiments de progéniteurs dans la moelle osseuse de quelques patients de la cohorte JAK2^{V617F} montre que la charge allélique est similaire à celle retrouvée dans les compartiments de progéniteurs au niveau du sang périphérique. L'IFN α semble donc avoir le même impact dans la moelle osseuse et dans le sang total.

Des effets différents des mutations motrices sur l'architecture hématopoïétique

Les NMP sont des hémopathies clonales de la CSH et les mutations JAK2^{V617F} et CALR^{mut} sont déjà présentes dans les compartiments progéniteurs humains les plus immatures (CD34⁺CD38⁻CD90⁺)⁷⁹. Toutefois, l'impact de ces mutations sur les CSH et la nécessité de leur présence dans l'émergence de la maladie sont largement méconnus.

Dans les études cliniques, la charge allélique de JAK2^{V617F} et de CALR^{mut} est évaluée seulement dans les granuleux. Dans les PV/TE, le clone JAK2^{V617F} ne domine pas totalement l'hématopoïèse. Même longtemps après l'initiation de la maladie, les clones sauvages sont présents et participent à l'hématopoïèse polyclonale. Ainsi, chez un patient, les cellules homozygotes, hétérozygotes et sauvages peuvent coexister et la charge allélique de JAK2^{V617F} est le reflet de ce mélange. D'après les résultats de notre étude et d'autres études cliniques, il est évident que l'effet de JAK2^{V617F} est limité dans le sens où l'amplification clonale a principalement lieu pendant la différenciation, avec une proportion faible de CSH JAK2^{V617F} mais une charge allélique élevée dans les cellules matures^{80,81}. Par ailleurs, la charge allélique de CALR^{mut} est, quant à elle, très élevée dans tous les compartiments progéniteurs et matures et ceci suggère une dominance clonale à des

stades plus précoces que dans un contexte JAK2^{V617F}. En effet, la mutation CALR est principalement retrouvée à l'état hétérozygote, le clone muté acquiert ainsi un avantage prolifératif à des stades plus souches que la mutation JAK2^{V617F}, et envahit l'hématopoïèse qui devient alors clonale. La différence d'architecture clonale entre un contexte d'hématopoïèse CALR^{mut} et d'hématopoïèse JAK2^{V617F} conduit toutefois à des maladies et à des phénotypes cliniques semblables. En effet, CALR^{mut} induit une dominance clonale importante au niveau CSH tout en procurant un avantage seulement au niveau de la lignée mégacaryocytaire en induisant des phénotypes de TE ou de MF. Par ailleurs, JAK2^{V617F} a un effet faible au niveau CSH mais induit une dominance clonale élevée dans les lignées mégacaryocytaire, érythrocytaire et granuleuse ce qui peut permettre le développement du spectre entier des NMP classiques.

Schématiquement, la mutation JAK2^{V617F} est principalement retrouvée à l'état hétérozygote dans les TE et à l'état homozygote dans les PV. Concernant CALR^{mut}, elle est très rarement retrouvée à l'état homozygote et n'induit jamais de phénotype PV. De plus, il a été montré que, dans les granuleux de patients traités à l'IFN α , l'action de l'IFN α semble corrélée à la présence de JAK2^{V617F} puisque les clones homozygotes diminuent plus rapidement que les hétérozygotes et les sauvages³⁵⁶. Notre étude confirme ces résultats à l'échelle des CSH chez les patients répondeurs où l'on retrouve une dynamique d'éradication plus intense des clones homozygotes au profit des hétérozygotes et des sauvages, et confirme les travaux menés *in vitro*³²⁰. Ainsi, l'efficacité de l'IFN α semble liée au niveau d'expression de JAK2^{V617F}. Cette efficacité pourrait aussi être liée au niveau d'expression de CALR^{mut} mais nous ne retrouvons que très rarement la mutation CALR à l'état homozygote. En d'autres termes, nous ne pouvons pas réellement exclure un effet de l'IFN α sur les clones homozygotes CALR^{mut} qui sont, par ailleurs, très peu représentés. Cet effet serait peut-être plus visible si des clones homozygotes étaient présents en plus grande quantité, étant donné que les clones CALR^{mut} sont principalement retrouvés à l'état hétérozygote et qu'ils persistent tout autant que les clones JAK2^{V617F} hétérozygotes.

Enfin, le ciblage préférentiel des clones homozygotes JAK2^{V617F} par l'IFN α peut s'expliquer par une plus forte réponse à l'IFN α des cellules homozygotes comparativement aux cellules hétérozygotes JAK2^{V617F}.

Impact du microenvironnement et de l'immunité dans la réponse à l'IFN α

Le ciblage équivalent de CALR^{mut} par l'IFN α dans tous les compartiments hématopoïétiques soutient l'hypothèse d'un mécanisme d'action plutôt immunologique, même si une action préférentielle de l'IFN α au niveau CSH pourrait conduire aux mêmes résultats. Effectivement, CALR est une protéine immunogène qui peut être reconnue à la surface cellulaire par les phagocytes. Bien qu'on ne connaisse pas la capacité de CALR^{mut} à induire une réponse immune, cette protéine mutée est exposée à la surface cellulaire et pourrait ainsi aider la réponse à l'IFN α , notamment par un meilleur recrutement des phagocytes ou des cellules dendritiques. Concernant JAK2^{V617F}, les données sur son immunogénicité sont moins bien établies et il peut s'agir d'un effet indirect. En effet, la surexpression de certains antigènes dans des PV JAK2^{V617F} traitées à l'IFN α ³⁰⁹ suggère une implication des lymphocytes T cytotoxiques dans la réponse moléculaire qui reste toutefois encore à démontrer. Enfin, Mullally *et al.* a montré que l'IFN α n'a plus aucun effet curatif lors de transplantations de moelle de souris JAK2^{V617F}-IFNAR^{-/-} dans des souris receveuses sauvages. Ceci suggère que l'effet de l'IFN α est indépendant du microenvironnement, que son action est spécifiquement dirigée contre le clone JAK2^{V617F} et que ce ciblage est strictement en lien avec la réponse à l'IFN α ³²⁵.

Des intensités de signalisation différentes de l'IFN α

Les mutations CALR^{mut} et JAK2^{V617F} étant impliquées dans le même type de pathologies et dans la même voie de signalisation JAK2/STAT, nous pouvons espérer des effets moléculaires comparables, à savoir une diminution plus ou moins similaire de la charge allélique des deux mutations dans les différents compartiments hématopoïétiques. A médiane de temps de traitement équivalente, la réponse moléculaire beaucoup plus faible chez les CALR^{mut} que chez les JAK2^{V617F} suggère que ces protéines mutées fonctionnent selon des mécanismes différents et que l'IFN α n'aurait pas le même effet vis-à-vis de ces deux mutations.

L'effet de JAK2^{V617F} à travers la voie JAK2/STAT peut tout d'abord s'expliquer par l'induction de l'expression de SOCS1, aussi impliquée dans les effets antiprolifératifs de l'IFN α et régulateur négatif de la voie JAK2/STAT. En effet, l'IFN α inhibe la voie

JAK2/STAT induite par la TPO en induisant l'expression de SOCS1 dans des progéniteurs mégacaryocytaires¹⁴⁸. La signalisation médiée par MPL est aussi nécessaire à la régulation des CSH³⁶⁴. Ainsi, la sur-signalisation induite par des effets additifs entre l'IFN α et JAK2^{V617F} bloquerait la voie JAK2/STAT, en exprimant SOCS1 plus efficacement dans un contexte muté, et induirait un arrêt de la prolifération. Dans cette situation, il est difficile de penser que les SOCS induits par l'IFN α élimineraient plus vite les clones JAK2^{V617F} homozygotes. D'ailleurs, les inhibiteurs de JAK2 en clinique n'induisent que très peu de réponses moléculaires suggérant ainsi que l'inhibition de JAK2 cible à la même vitesse tous les clones, qu'ils soient sauvages, mutés hétérozygotes ou homozygotes²⁶¹.

D'une part, le traitement à l'IFN α des lignées JAK2^{V617F} nous informe sur le mécanisme impliqué dans la rémission moléculaire des patients JAK2^{V617F}. D'autre part, nos résultats montrent une potentialisation de la réponse à l'IFN α dans un contexte JAK2^{V617F}, aussi bien dans les lignées murines Ba/F3 que dans les cellules primaires de patients. Dans ces contextes cellulaires et plus particulièrement dans les Ba/F3, l'expression et de la phosphorylation de STAT1 ainsi que l'expression de gènes cibles de l'IFN α (ISG15, USP18) sont augmentées.

Par ailleurs, nous avons remarqué que la phosphorylation des deux isoformes de STAT1 (STAT1A et STAT1B) diffère entre les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{WT} et Ba/F3 MPL-JAK2^{V617F}. En effet, l'isoforme STAT1A est plus phosphorylé en contexte JAK2^{WT} tandis que les deux isoformes sont phosphorylées de façon quasiment équivalente dans le contexte JAK2^{V617F}. Ainsi, l'IFN α pourrait activer de manière plus importante l'isoforme STAT1B dans les cellules JAK2^{V617F}. Des problèmes de spécificité de l'anticorps dirigé contre pSTAT2 nous ont malheureusement empêchés d'étudier la phosphorylation de STAT2 après stimulation à l'IFN α . Les effets de l'IFN α sur la phosphorylation de STAT2 sont spécifiques de l'IFN α contrairement à STAT1 qui est une protéine possiblement activée par d'autres voies notamment celle de l'IFN γ . Dans les cellules primaires de patients, nous montrons que JAK2^{V617F} sensibilise à l'effet de l'IFN α du fait d'une induction soutenue du niveau des transcrits *IFIT1*, *MX1*, *PML* et *STAT2*. D'autres ISGs devront être testés pour conforter ces résultats.

Concernant les lignées murines Ba/F3-MPL CALR, le niveau de la protéine STAT1 et le niveau des transcrits d'ISGs (ISG15, USP18) sont comparables dans les cellules

CALR^{wt} ou CALR^{mut} et la phosphorylation de STAT1, bien que plus importante dans les cellules CALR^{mut}, atteint un plateau à de plus faibles concentrations d'IFN α par rapport aux cellules JAK2^{V617F}. Cette activation constitutive médiée spécifiquement par JAK2^{V617F} induirait donc une sur-signalisation globale qui forcerait les cellules à entrer potentiellement en sénescence ou en apoptose. Ces hypothèses restent à confirmer.

Enfin, la différence d'efficacité de l'IFN α chez les patients JAK2^{V617F} et CALR^{mut} ne peut pas être complètement due à leur charge allélique. En effet, des différences de niveau et de phosphorylation de STAT1 sont observées entre les lignées Ba/F3 JAK2^{V617F} et CALR^{mut} bien qu'une expression massive de JAK2 et de CALR est induite dans ces lignées et mime l'état homozygote retrouvé chez certains patients.

Deux modèles peuvent alors découler de ces résultats: JAK2^{V617F} stimule la réponse à l'IFN α soit par un amorçage indirect de la signalisation de l'IFN α qui augmenterait le niveau de STAT1 (et peut-être celui de STAT2), soit par un amorçage direct en créant une interaction illégitime avec l'un des composants du complexe de l'IFN α : JAK1, TYK2 ou IFNAR1/2. L'une ou l'autre des hypothèses est pour l'heure encore possible et il faudra réaliser des immunoprécipitations de JAK2 et de JAK1/TYK2/IFNAR pour pouvoir trancher.

Impact de deux inhibiteurs de JAK2 sur la réponse à l'IFN α

Nous avons ensuite comparé les effets de deux inhibiteurs de JAK2 (ruxolitinib et BMS911543) sur les phosphorylations de STAT5 et de STAT1 dans les lignées murines et dans les cellules primaires de patients. STAT5 est activée principalement par la voie TPO/JAK2 mais aussi par la voie de l'IFN α alors que STAT1 est surtout activée par la voie de l'IFN α médiée par TYK2 et JAK1. Ainsi, nous démontrons que le ruxolitinib est un inhibiteur de JAK1 et JAK2 tandis que le BMS911543 est plus spécifique de JAK2, ce qui est cohérent avec la littérature²⁸⁶. Cependant, les résultats obtenus sur la phosphorylation de STAT5 stimulée par la TPO dans les cellules JAK2^{V617F} ne sont pas probants. En effet, nous n'observons pas de différence avec ou sans TPO, alors que la TPO est censée activer plus intensément la phosphorylation de STAT5.

Par la suite, les effets de l'inhibition spécifique de JAK2 par le BMS911543 sur la voie de l'IFN α ont été étudiés dans les lignées murines Ba/F3-MPL, dans les cellules

primaires ainsi que dans un modèle *in vivo* de greffe primaire mis en compétition (40% KI JAK2^{V617F}, 60% WT). Nous avons alors mesuré la phosphorylation de STAT1 et avons constaté des effets mineurs en contexte JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F}. En revanche, en présence de JAK2^{V617F}, un prétraitement par le BMS911543 induit une augmentation de l'expression des ISGs induits par l'IFN α à la fois dans les lignées cellulaires et les cellules primaires. Ainsi, JAK2^{V617F} potentialise les effets de l'IFN α sur le niveau des transcrits d'*IFIT1*, *MX1*, *PML*, *STAT2* et *ISG15*.

Au total, ces résultats suggèrent que la présence de JAK2^{V617F} a un rôle important à jouer sur la voie de l'IFN α et que cet effet est potentialisé en présence de BMS911543. En effet, l'inhibiteur est un compétiteur de l'ATP qui se fixe à JAK2 dans sa conformation active -particularité des inhibiteurs de type 1- et pourrait induire une accumulation de la forme JAK2 phosphorylée qui s'hétérodimériserait avec JAK1 ou TYK2 pour ainsi réactiver la voie JAK1/STAT1 comme précédemment décrit dans la littérature par Koppikar *et al.*²⁶¹.

En revanche, comme attendu, le ruxolitinib inhibe complètement la signalisation induite par l'IFN α et l'expression des ISGs dans les lignées murines et les cellules primaires. Ainsi, la combinaison de cet inhibiteur avec l'IFN α semble être un mauvais compromis bien que des essais cliniques soient encore en cours. En effet, des combinaisons de traitement à l'IFN α avec un inhibiteur plus spécifiques de JAK2 - comme le BMS911543- semblent plus judicieuses dans le sens où elles montrent d'une part une potentialisation de la réponse à l'IFN α dans les lignées et d'autre part une excellente réponse hématologique et moléculaire dans les souris JAK2^{V617F} au niveau des CSH, résultats de la partie 3 obtenus par l'équipe et auxquels j'ai participé.

Si les résultats ont permis de confirmer la sensibilisation de la voie de l'IFN α médiée par JAK2^{V617F}, ils n'ont pas permis de trancher entre les modèles de stimulation directe ou indirecte de la voie de l'IFN α par JAK2^{V617F}. De fait, les effets des inhibiteurs de JAK2 diffèrent entre la signalisation et l'induction des gènes cibles de l'IFN α . Dans le cas d'un amorçage direct, une potentialisation à la fois de la phosphorylation de STAT1 et des ISGs aurait été constatée. D'autres expériences pourraient permettre de discriminer l'une ou l'autre de ces hypothèses telles que l'utilisation de formes mutantes de JAK2^{V617F} ou la comparaison de la signalisation de l'IFN α et de l'expression des ISGs en présence d'inhibiteurs de JAK2 de type 2

qui inhibent JAK2 en conformation inactive et donc sous forme non phosphorylée. Dans le cas d'un amorçage direct, la combinaison de l'IFN α avec un inhibiteur de JAK2 de type 2 induirait alors une potentialisation des ISGs amoindrie voire anéantie. Il sera aussi crucial de déterminer la présence d'une interaction directe entre JAK2^{V617F} et JAK1/TYK2/IFNAR1/IFNAR2 par le biais d'immunoprécipitations. Ainsi, nous pourrions comparer les effets de stimulation de l'IFN α sur les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} prétraitées ou non au BMS911543 -inhibiteur de type 1- en comparaison avec le CHZ868 -inhibiteur de type 2.

Au total, JAK2^{V617F} sensibilise à l'induction de la phosphorylation de STAT1 et à l'expression de gènes cibles de la voie de l'IFN α . Toutefois, en présence d'un inhibiteur de JAK2 capable de l'inhiber spécifiquement mais de réactiver potentiellement des hétérodimères JAK2/JAK1, une augmentation du niveau des transcrits d'ISGs sans potentialisation de la phosphorylation de STAT1 est constatée.

Des mécanismes cellulaires variés de ciblage de JAK2^{V617F}

Chez la souris, le traitement à l'IFN γ induit une expansion des LSK *in vitro* et *in vivo* à travers la voie canonique IFNGR1-STAT1³⁶¹ avec un potentiel de différenciation biaisé vers les compartiments myéloïdes. L'exposition à l'IFN γ sur un modèle murin à infection chronique induit une augmentation des MPP, des ST-CSH mais aussi des LT-CSH en favorisant leur prolifération tout en compromettant leur potentiel de reconstitution à long terme³⁶². Toutefois, l'IFN γ inhibe aussi la prolifération des SLAM en empêchant les cellules quiescentes d'entrer en cycle ainsi qu'en inhibant l'activation de STAT5 médiée par la TPO. Cette inhibition passe par l'induction de SOCS1 et la dérégulation de la cycline D1 et de p57, deux gènes impliqués dans la prolifération des CSH³⁶³. D'autre part, MPL joue un rôle crucial sur la production, la quiescence et l'activité des CSH dans les modèles murins³⁶⁴ et G-CSFR est impliqué dans l'engagement des progéniteurs hématopoïétiques primitifs vers le compartiment myéloïde³⁶⁵. L'activation constitutive de JAK2^{V617F} en aval de ces récepteurs induirait alors une signalisation altérée et une modulation différente du compartiment CSH.

L'effet d'une exposition chronique à l'IFN α sur des CSH murines normales est controversé. En effet, Essers *et al.* montre que l'IFN α induit la prolifération et l'épuisement des CSH³²¹ tandis que Pietras *et al.* montre qu'une exposition

chronique à l'IFN α induit une prolifération des CSH par relâchement de la quiescence. Par ailleurs, l'activation de la voie p53 pro-apoptotique dans ces cellules induirait leur mort lorsqu'elles réentrent en cycle³²³.

La sensibilisation par JAK2^{V617F} à l'action de l'IFN α a probablement des conséquences sur les CSH en induisant l'apoptose, une dérégulation du cycle cellulaire ou la sénescence. Toutefois, l'implication de ces mécanismes reste pour l'heure très débattue.

D'un côté, il a été montré que l'IFN α permettait la prolifération des CSH JAK2^{V617F} en augmentant l'expression de gènes du cycle cellulaire et en diminuant l'expression de gènes impliqués dans la quiescence, et de l'autre, l'IFN α favoriserait l'apoptose des CSH mutées, du moins dans la rate^{324,325}. En effet, certaines voies de signalisation participent à l'action de l'IFN α dans les cellules primaires de NMP JAK2^{V617F} : l'IFN α peut directement activer l'apoptose par la voie p38/MNK-1 MAPK dans les CPSH^{320,329}. P53 induit par l'IFN α est un facteur apoptotique très important dans les CPSH JAK2^{V617F} et la combinaison d'IFN α avec un antagoniste de MDM2 dévoile une forte synergie de réponse, plus particulièrement au niveau CSH^{330,331}. La voie JAK2/STAT interagit avec l'IFN α puisque MDM2 est une cible de JAK2^{V617F}. Enfin, BCL-XL induit par JAK2^{V617F} limiterait l'apoptose induite dans les CPSH et l'utilisation de l'inhibiteur ABT-737 mène à une potentialisation de l'action de l'IFN α ³³².

Quant à CALR^{mut}, des études sont en cours pour comprendre plus précisément les mécanismes cellulaires induits par l'IFN α .

Stratification des NMP : vers une meilleure efficacité de l'IFN α dans le but de déjouer les résistances

L'étude du mécanisme d'action de l'IFN α chez les patients JAK2^{V617F} et CALR^{mut} traités a permis de déceler de nombreuses différences d'action : un ciblage différentiel des CPSH et des cellules matures JAK2^{V617F}, un ciblage différentiel des cellules matures JAK2^{V617F} et CALR^{mut}, un ciblage différentiel des CPSH JAK2^{V617F} et CALR^{mut}, ainsi qu'un ciblage différentiel des clones homozygotes ou hétérozygotes pour JAK2^{V617F}. En effet, la réponse moléculaire est dépendante non seulement du statut mutationnel de JAK2 et de CALR, mais aussi de la présence ou non de mutations associées. Il serait donc judicieux de stratifier les malades par rapport à

ces différents critères pour optimiser au mieux la réponse thérapeutique à l'IFN α . Toutes nos données sont d'ailleurs en train d'être modélisées par un algorithme mathématique afin de pouvoir prédire la réponse au traitement en collaboration avec M. Hochberg et R. Noble. Cette stratégie permettrait une meilleure sélection des patients traités et de meilleurs résultats sur le long terme. L'adaptation des temps de traitement ainsi que de la dose d'IFN α en fonction du type de mutations pourraient aussi être envisageables, avec des durées de traitement plus longues dans le but de rétablir une hématopoïèse polyclonale concernant CALR^{mut}.

Comprendre le mécanisme d'action de l'IFN α permettrait de le combiner à d'autres molécules pour réduire le temps de traitement et les doses ainsi que pour limiter les effets secondaires. En effet, le traitement à l'IFN α est lourd et long et les effets secondaires constituent une limite chez beaucoup de patients. Au vu de nos travaux, nous proposons de combiner l'IFN α à un inhibiteur spécifique de JAK2 qui pourra potentialiser les effets de l'IFN α , plutôt qu'à un inhibiteur de JAK1/2 qui annule ses effets. Dans l'avenir, cette thérapie pourrait aussi être combinée à des molécules qui pourraient agir en synergie avec JAK2^{V617F} ou CALR^{mut}, notamment les antagonistes de MDM2 (Nutlin-like) ou des reconstituteurs de p53 muté (Prima-met) dans le but de favoriser l'activation de la voie pro-apoptotique. D'autre part, le traitement IFN α couplé à l'arsenic, une combinaison déjà utilisée dans les leucémies aiguës à cellules T (ATL), connaît une bonne efficacité de réponse. Cette combinaison semble aussi très prometteuse dans le cadre des NMP sur notre modèle de souris JAK2^{V617F}.

Enfin, l'analyse qPCR sur cellule unique des cellules progénitrices de patients traités en clinique à l'IFN α suggère que l'expression des gènes de la voie de l'IFN α ou de JAK/STAT varie non pas en fonction de l'état mutationnel de la cellule mais plutôt en fonction de la réponse moléculaire globale du patient. Ainsi, il est possible que des facteurs de prédisposition germinaux et intrinsèques à chaque individu aient aussi un impact majeur dans la réponse ou dans la résistance à l'IFN α ³⁶⁷.

Références

1. Godin, I. & Cumano, A. Les cellules souches hématopoïétiques. *médecine/sciences* **23**, 681–684 (2007).
2. Wilson, A. *et al.* Dormant and Self-Renewing Hematopoietic Stem Cells and Their Niches. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1106**, 64–75 (2007).
3. Akashi, K., Reya, T., Dalma-Weiszhausz, D. & Weissman, I. L. Lymphoid precursors. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 144–50 (2000).
4. Rieger, M. A. & Schroeder, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a008250 (2012).
5. Till, J. E. & McCulloch, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–22 (1961).
6. Metcalf, D. & Bradley, R. The growth and erythropoietic activity of spleen grafts placed under the kidney capsule. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **43**, 229–36 (1965).
7. Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **133**, 157–165 (1984).
8. Terstappen, L., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P. & Loken, M. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* **77**, (1991).
9. Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O. I. & Dick, J. E. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat. Med.* **9**, 959–963 (2003).
10. Majeti, R., Park, C. Y. & Weissman, I. L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* **1**, 635–45 (2007).
11. Anjos-Afonso, F. *et al.* CD34 (-) cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell* **13**, 161–74 (2013).
12. Ziegler, B. L. *et al.* KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* **285**, 1553–1558 (1999).
13. Ratajczak, J. *et al.* Evidence that human haematopoietic stem cells (HSC) do not reside within the CD34+KIT- cell population. *Ann. Transplant.* **4**, 22–30 (1999).
14. Gunsilius, E., Gastl, G. & Petzer, A. L. Hematopoietic stem cells. *Biomed. Pharmacother. Biomédecine Pharmacothérapie* **55**, 186–194 (2001).
15. Benveniste, P. *et al.* Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* **6**, 48–58 (2010).
16. Notta, F. *et al.* Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* **333**, 218–221 (2011).
17. Ogawa, M. Stochastic model revisited. *Int. J. Hematol.* **69**, 2–5 (1999).
18. Müller-Sieburg, C.E., Cho, R.H., Thoman, M., Adkins, B. & Sieburg, H.B. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood* **100**, 1302–1309 (2002).
19. Azuara, V. *et al.* Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat. Cell Biol.* **8**, 532–538 (2006).
20. Orkin, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 57–64 (2000).
21. Seita, J. & Weissman, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **2**, 640–653 (2010).
22. Yamamoto, R. *et al.* Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell* **154**, 1112–1126 (2013).
23. Mercier, F. E. & Scadden, D. T. Not All Created Equal: Lineage Hard-Wiring in the Production of Blood. *Cell* **163**, 1568–1570 (2015).
24. Perié, L., Duffy, K. R., Kok, L., de Boer, R. J. & Schumacher, T. N. The Branching Point in Erythro-Myeloid Differentiation. *Cell* **163**, 1655–1662 (2015).
25. Velten, L. *et al.* Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat. Cell Biol.* **19**, 271–281 (2017).
26. Macaulay, I. C. *et al.* Single-Cell RNA-Sequencing Reveals a Continuous Spectrum of Differentiation in Hematopoietic Cells. *Cell Rep.* **14**, 966–977 (2016).
27. Nestorowa, S. *et al.* A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood* **128**, e20–e31 (2016).

28. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: A Human Perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).
29. Bradford, G. B., Williams, B., Rossi, R. & Bertoncello, I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp. Hematol.* **25**, 445–53 (1997).
30. Domen, J., Gandy, K. L. & Weissman, I. L. Systemic overexpression of BCL-2 in the hematopoietic system protects transgenic mice from the consequences of lethal irradiation. *Blood* **91**, 2272–82 (1998).
31. Robb, L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* **26**, 6715–23 (2007).
32. Boulais, P. E. & Frenette, P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* **125**, 2621–9 (2015).
33. Wang, X. *et al.* Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Mouse Fetal Bone Marrow. *Stem Cells* **24**, 482–493 (2006).
34. Dazzi, F., Ramasamy, R., Glennie, S., Jones, S. P. & Roberts, I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* **20**, 161–71 (2006).
35. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).
36. Dameshek, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* **6**, 372–5 (1951).
37. Nowell P. C. & Hungerford, D. A. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J. Natl. Cancer Inst.* **25**, 85–109 (1960).
38. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–51 (2009).
39. Tefferi, A. & Vardiman, J. W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14–22 (2008).
40. Rowley, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290–3 (1973).
41. Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A. M., Witte, O. N. & Baltimore, D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* **233**, 212–4 (1986).
42. Cools, J. *et al.* A Tyrosine Kinase Created by Fusion of the *PDGFRA* and *FIP1L1* Genes as a Therapeutic Target of Imatinib in Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* **348**, 1201–1214 (2003).
43. Maxson, J. E. *et al.* Oncogenic CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia and atypical CML. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1781–90 (2013).
44. Johansson, P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin. Thromb. Hemost.* **32**, 171–3 (2006).
45. Cervantes, F., Passamonti, F. & Barosi, G. Life expectancy and prognostic factors in the classic BCR/ABL-negative myeloproliferative disorders. *Leukemia* **22**, 905–914 (2008).
46. Barbui, T., Carobbio, A., Rambaldi, A. & Finazzi, G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood* **114**, 759–63 (2009).
47. Beer, P. A. *et al.* Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* **115**, 2891–2900 (2010).
48. Prchal, J. F. & Axelrad, A. A. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382 (1974).
49. Barbui, T. *et al.* Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood* **115**, 778–782 (2010).
50. Thiele, J. & Kvasnicka, H. M. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **4**, 33–40 (2009).
51. Tefferi, A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J. Clin. Oncol.* **23**, 8520–30 (2005).
52. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
53. Kralovics, R. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779–90 (2005).
54. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387–397 (2005).
55. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054–1061 (2005).

56. Bandaranayake, R. M. *et al.* Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 754–9 (2012).
57. Klampfl, T. *et al.* Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood* **118**, 167–176 (2011).
58. Rumi, E. *et al.* Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* **124**, 1062–1069 (2014).
59. Scott, L. M., Scott, M. A., Campbell, P. J. & Green, A. R. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood* **108**, 2435–2437 (2006).
60. Kralovics, R., Guan, Y. & Prchal, J. T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **30**, 229–36 (2002).
61. Scott, L. M. The JAK2 exon 12 mutations: a comprehensive review. *Am. J. Hematol.* **86**, 668–76 (2011).
62. Passamonti, F. *et al.* Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* **117**, 2813–2816 (2011).
63. Grisouard, J. *et al.* JAK2 exon 12 mutant mice display isolated erythrocytosis and changes in iron metabolism favoring increased erythropoiesis. *Blood* **128**, 839–51 (2016).
64. Li, S. *et al.* Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations. *Blood* **111**, 3863–3866 (2008).
65. Pikman, Y. *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* **3**, e270 (2006).
66. Pardnani, A. D. *et al.* MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* **108**, 3472–3476 (2006).
67. Defour, J.-P., Chachoua, I., Pecquet, C. & Constantinescu, S. N. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **30**, 1214–1216 (2016).
68. Ding, J. *et al.* Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* **103**, 4198–200 (2004).
69. Cabagnols, X. *et al.* Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* **127**, 333–342 (2016).
70. Milosevic Feenstra, J. D. *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127**, 325–332 (2016).
71. Vannucchi, A. M. *et al.* Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. *Blood* **112**, 844–847 (2008).
72. Guglielmelli, P. *et al.* Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring Mpl mutation. *Br. J. Haematol.* **137**, 244–7 (2007).
73. Klampfl, T. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379–90 (2013).
74. Nangalia, J. *et al.* Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391–2405 (2013).
75. Cabagnols, X. *et al.* Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* **29**, 249–252 (2015).
76. Tefferi, A. *et al.* Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* **28**, 1568–1570 (2014).
77. Adamson, J. W., Fialkow, P. J., Murphy, S., Prchal, J. F. & Steinmann, L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. *N. Engl. J. Med.* **295**, 913–6 (1976).
78. Delhommeau, F. *et al.* Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* **109**, 71–77 (2007).
79. Jamieson, C. H. M. *et al.* The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 6224–6229 (2006).
80. Dupont, S. *et al.* The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* **110**, 1013–1021 (2007).
81. Anand, S. *et al.* Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 177–81 (2011).

82. James, C. *et al.* The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood* **112**, 2429–2438 (2008).
83. Chaligné, R. *et al.* Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood* **110**, 3735–43 (2007).
84. Angona, A. *et al.* Characterization of CD34+ hematopoietic progenitor cells in JAK2V617F and CALR-mutated myeloproliferative neoplasms. *Leuk. Res.* **48**, 11–5 (2016).
85. Parganas, E. *et al.* Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385–95 (1998).
86. Godfrey, A. L. *et al.* JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood* **120**, 2704–2707 (2012).
87. Saliba, J. *et al.* Heterozygous and Homozygous JAK2V617F States Modeled by Induced Pluripotent Stem Cells from Myeloproliferative Neoplasm Patients. *PLoS One* **8**, e74257 (2013).
88. Kralovics, R., Stockton, D. W. & Prchal, J. T. Clonal hematopoiesis in familial polycythemia vera suggests the involvement of multiple mutational events in the early pathogenesis of the disease. *Blood* **102**, 3793–3796 (2003).
89. Li, Y. *et al.* Spontaneous megakaryocyte colony formation in myeloproliferative disorders is not neutralizable by antibodies against IL3, IL6 and GM-CSF. *Br. J. Haematol.* **87**, 471–6 (1994).
90. Axelrad, A. A., Eskinazi, D., Correa, P. N. & Amato, D. Hypersensitivity of circulating progenitor cells to megakaryocyte growth and development factor (PEG-rHu MGDF) in essential thrombocythemia. *Blood* **96**, 3310–21 (2000).
91. Mondet, J. *et al.* Endogenous megakaryocytic colonies underline association between megakaryocytes and calreticulin mutations in essential thrombocythemia. *Haematologica* **100**, e176–8 (2015).
92. Lacout, C. *et al.* JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* **108**, 1652–1660 (2006).
93. Marty, C. *et al.* Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* **127**, 1317–1324 (2016).
94. Elf, S. *et al.* Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov.* **6**, 368–381 (2016).
95. Shide, K. *et al.* Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia* **31**, 1136–1144 (2017).
96. Marty, C. *et al.* Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* **116**, 783–787 (2010).
97. Li, J. *et al.* JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood* **116**, 1528–1538 (2010).
98. Mullally, A. *et al.* Physiological Jak2V617F Expression Causes a Lethal Myeloproliferative Neoplasm with Differential Effects on Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cancer Cell* **17**, 584–596 (2010).
99. Li, J. *et al.* Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage. *Blood* **131**, 649–661 (2018).
100. Skoda, R. C. JAK2 impairs stem cell function? *Blood* **116**, 1392–1393 (2010).
101. Campbell, P. J. *et al.* Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet* **366**, 1945–1953 (2005).
102. Vannucchi, A. M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Pardanani, A. & Tefferi, A. Clinical correlates of JAK2V617F presence or allele burden in myeloproliferative neoplasms: a critical reappraisal. *Leukemia* **22**, 1299–1307 (2008).
103. Besancenot, R. *et al.* JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood* **124**, 2104–15 (2014).
104. Oh, S. T. *et al.* Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* **116**, 988–92 (2010).
105. Lasho, T. L., Pardanani, A. & Tefferi, A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1189–90 (2010).
106. Cleyrat, C. *et al.* Mpl traffics to the cell surface through conventional and unconventional routes. *Traffic Cph. Den.* **15**, 961–982 (2014).
107. Schmidt, M. H. H. & Dikic, I. The Cbl interactome and its functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 907–919 (2005).
108. Albu, R.I. & Constantinescu, S. N. Extracellular domain N-glycosylation controls human thrombopoietin receptor cell surface levels. *Front. Endocrinol.* **2**, 71 (2011).

109. Hitchcock, I.S., Chen, M. M., King, J.R. & Kaushansky, K. YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood* **112**, 2222–2231 (2008).
110. Grand, F. H. *et al.* Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**, 6182–6192 (2009).
111. Sanada, M. *et al.* Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* **460**, 904–908 (2009).
112. Milosevic, J. D. *et al.* Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. *Am. J. Hematol.* **87**, 1010–6 (2012).
113. Krebs, D. L. & Hilton, D. J. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 16), 2813–9 (2000).
114. Teofili, L. *et al.* Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. *Int. J. cancer* **123**, 1586–92 (2008).
115. Quentmeier, H. *et al.* SOCS2: inhibitor of JAK2V617F-mediated signal transduction. *Leukemia* **22**, 2169–2175 (2008).
116. Hookham, M. B. *et al.* The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3. *Blood* **109**, 4924–9 (2007).
117. Haan, S. *et al.* SOCS-mediated downregulation of mutant Jak2 (V617F, T875N and K539L) counteracts cytokine-independent signaling. *Oncogene* **28**, 3069–3080 (2009).
118. Stegelmann, F. *et al.* High-resolution single-nucleotide polymorphism array-profiling in myeloproliferative neoplasms identifies novel genomic aberrations. *Haematologica* **95**, 666–669 (2010).
119. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289–301 (2009).
120. Mahfoudhi, E. *et al.* [Properties and biological roles of TET proteins during embryogenesis and in hematopoiesis]. *Med. Sci. (Paris)*. **31**, 268–74 (2015).
121. Pronier, E. *et al.* Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. *Blood* **118**, 2551–5 (2011).
122. Quivoron, C. *et al.* TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* **20**, 25–38 (2011).
123. Busque, L. *et al.* Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat. Genet.* **44**, 1179–81 (2012).
124. Lundberg, P. *et al.* Somatic mutations in calreticulin can be found in pedigrees with familial predisposition to myeloproliferative neoplasms. *Blood* **123**, 2744–2745 (2014).
125. Ortmann, C. A. *et al.* Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **372**, 601–612 (2015).
126. Challen, G. A. *et al.* Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat. Genet.* **44**, 23–31 (2012).
127. Nangalia, J. *et al.* DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica* **100**, e438–42 (2015).
128. Shimizu, T. *et al.* Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. *J. Exp. Med.* **213**, 1479–96 (2016).
129. Yang, Y., Akada, H., Nath, D., Hutchison, R. E. & Mohi, G. Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood* **127**, 3410–3423 (2016).
130. Score, J. *et al.* Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **119**, 1208–1213 (2012).
131. Gelsi-Boyer, V. *et al.* Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **145**, 788–800 (2009).
132. Lasho, T. L. *et al.* Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv.* **2**, 370–380 (2018).
133. Vannucchi, A. M. *et al.* Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* **27**, 1861–1869 (2013).
134. Abdel-Wahab, O. *et al.* Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J. Exp. Med.* **210**, 2641–2659 (2013).
135. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **18**, 553–67 (2010).
136. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69 (2011).

137. Harutyunyan, A., Klampfl, T., Cazzola, M. & Kralovics, R. p53 lesions in leukemic transformation. *N. Engl. J. Med.* **364**, 488–90 (2011).
138. Feng, J. *et al.* Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 2497–501 (1997).
139. Lindauer, K., Loerting, T., Liedl, K. R. & Kroemer, R. T. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising the two carboxy-terminal domains reveals a mechanism for autoregulation. *Protein Eng.* **14**, 27–37 (2001).
140. Ungureanu, D. *et al.* The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 971–6 (2011).
141. Royer, Y., Staerk, J., Costuleanu, M., Courtoy, P. J. & Constantinescu, S. N. Janus Kinases Affect Thrombopoietin Receptor Cell Surface Localization and Stability. *J. Biol. Chem.* **280**, 27251–27261 (2005).
142. Huang, L. J., Constantinescu, S. N. & Lodish, H. F. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell* **8**, 1327–38 (2001).
143. Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G. & Lodish, H. F. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell* **80**, 729–38 (1995).
144. Jiao, H. *et al.* Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6985–92 (1996).
145. Yoshimura, A. *et al.* A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors. *EMBO J.* **14**, 2816–26 (1995).
146. Sasaki, A. *et al.* CIS3/SOCS-3 Suppresses Erythropoietin (EPO) Signaling by Binding the EPO Receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* **275**, 29338–29347 (2000).
147. Sasaki, A. *et al.* Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells* **4**, 339–51 (1999).
148. Wang, Q., Miyakawa, Y., Fox, N. & Kaushansky, K. Interferon-alpha directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood* **96**, 2093–9 (2000).
149. Tong, W., Zhang, J. & Lodish, H. F. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* **105**, 4604–4612 (2005).
150. Tong, W. & Lodish, H. F. Lnk Inhibits Tpo-mpl Signaling and Tpo-mediated Megakaryocytopoiesis. *J. Exp. Med.* **200**, 569–580 (2004).
151. Saur, S. J., Sangkhae, V., Geddis, A. E., Kaushansky, K. & Hitchcock, I. S. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* **115**, 1254–1263 (2010).
152. Shuai, K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* **19**, 2638–2644 (2000).
153. Jones, A. V. *et al.* Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* **106**, 2162–2168 (2005).
154. Steensma, D. P. *et al.* The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both “atypical” myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood* **106**, 1207–1209 (2005).
155. Scott, L. M. *et al.* The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood* **106**, 2920–2921 (2005).
156. Staerk, J., Kallin, A., Demoulin, J.-B., Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK1 and Tyk2 Activation by the Homologous Polycythemia Vera JAK2 V617F Mutation. *J. Biol. Chem.* **280**, 41893–41899 (2005).
157. Wernig, G. *et al.* The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood* **111**, 3751–3759 (2008).
158. Lu, X., Huang, L. J.-S. & Lodish, H. F. Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F. *J. Biol. Chem.* **283**, 5258–66 (2008).
159. Scott, L. M. *et al.* JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 459–468 (2007).
160. Mead, A. J., Rugless, M. J., Jacobsen, S. E. W. & Schuh, A. Germline JAK2 Mutation in a Family with Hereditary Thrombocytosis. *N. Engl. J. Med.* **366**, 967–969 (2012).
161. Mead, A. J. *et al.* Impact of isolated germline JAK2V617I mutation on human hematopoiesis. *Blood* **121**, 4156–65 (2013).

162. Marty, C. *et al.* Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* **123**, 1372–1383 (2014).
163. Walz, C. *et al.* Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2V617F in mice. *Blood* **119**, 3550–3560 (2012).
164. Yan, D., Hutchison, R. E. & Mohi, G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood* **119**, 3539–3549 (2012).
165. Socolovsky, M. *et al.* Ineffective erythropoiesis in Stat5a(-/-)5b(-/-) mice due to decreased survival of early erythroblasts. *Blood* **98**, 3261–73 (2001).
166. Socolovsky, M., Fallon, A. E., Wang, S., Brugnara, C. & Lodish, H. F. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a-/-5b-/- mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell* **98**, 181–91 (1999).
167. Wagner, K. U. *et al.* Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development* **127**, 4949–58 (2000).
168. Silva, M. *et al.* Expression of Bcl-x in erythroid precursors from patients with polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **338**, 564–71 (1998).
169. Garcon, L. *et al.* Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* **108**, 1551–1554 (2006).
170. Lelièvre, H. *et al.* Oncogenic kinases of myeloproliferative disorders induce both protein synthesis and G1 activators. *Leukemia* **20**, 1885–1888 (2006).
171. Walz, C. *et al.* Activated Jak2 with the V617F point mutation promotes G1/S phase transition. *J. Biol. Chem.* **281**, 18177–83 (2006).
172. Marty, C. *et al.* A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* **27**, 2187–2195 (2013).
173. Zou, H., Yan, D. & Mohi, G. Differential biological activity of disease-associated JAK2 mutants. *FEBS Lett.* **585**, 1007–1013 (2011).
174. Gozgit, J. M. *et al.* Effects of the JAK2 inhibitor, AZ960, on Pim/BAD/BCL-xL survival signaling in the human JAK2 V617F cell line SET-2. *J. Biol. Chem.* **283**, 32334–43 (2008).
175. Akada, H. *et al.* Efficacy of vorinostat in a murine model of polycythemia vera. *Blood* **119**, 3779–3789 (2012).
176. Puigdecenet, E. *et al.* Gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia. *Leukemia* **22**, 1368–76 (2008).
177. Schwemmers, S. *et al.* JAK2V617F-negative ET patients do not display constitutively active JAK/STAT signaling. *Exp. Hematol.* **35**, 1695–703 (2007).
178. Wood, A. D. *et al.* ID1 promotes expansion and survival of primary erythroid cells and is a target of JAK2V617F-STAT5 signaling. *Blood* **114**, 1820–30 (2009).
179. Gautier, E.-F. *et al.* The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene. *Blood* **119**, 1190–1199 (2012).
180. Chen, E. *et al.* Distinct Clinical Phenotypes Associated with JAK2V617F Reflect Differential STAT1 Signaling. *Cancer Cell* **18**, 524–535 (2010).
181. Duek, A. *et al.* Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood* **123**, 3943–3950 (2014).
182. Helgason, C. D. *et al.* Targeted disruption of SHIP leads to hemopoietic perturbations, lung pathology, and a shortened life span. *Genes Dev.* **12**, 1610–20 (1998).
183. Moody, J. L., Xu, L., Helgason, C. D. & Jirik, F. R. Anemia, thrombocytopenia, leukocytosis, extramedullary hematopoiesis, and impaired progenitor function in Pten+/-SHIP-/- mice: a novel model of myelodysplasia. *Blood* **103**, 4503–4510 (2004).
184. Laubach, J. P. *et al.* Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Exp. Hematol.* **37**, 1411–22 (2009).
185. Bumm, T. G. P. *et al.* Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. *Cancer Res.* **66**, 11156–65 (2006).
186. Shide, K. *et al.* Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia* **22**, 87–95 (2008).
187. Akada, H. *et al.* Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* **115**, 3589–3597 (2010).
188. Harir, N. *et al.* Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood* **109**, 1678–1686 (2007).
189. Darley, R. L., Hoy, T. G., Baines, P., Padua, R. A. & Burnett, A. K. Mutant N-RAS induces erythroid lineage dysplasia in human CD34+ cells. *J. Exp. Med.* **185**, 1337–47 (1997).

190. Zhang, J., Socolovsky, M., Gross, A. W. & Lodish, H. F. Role of Ras signaling in erythroid differentiation of mouse fetal liver cells: functional analysis by a flow cytometry-based novel culture system. *Blood* **102**, 3938–3946 (2003).
191. Zhang, J. & Lodish, H. F. Constitutive activation of the MEK/ERK pathway mediates all effects of oncogenic H-ras expression in primary erythroid progenitors. *Blood* **104**, 1679–1687 (2004).
192. Braun, B. S. *et al.* Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 597–602 (2004).
193. Tokunaga, M. *et al.* BCR-ABL but Not JAK2 V617F Inhibits Erythropoiesis through the Ras Signal by Inducing p21^{CIP1/WAF1}. *J. Biol. Chem.* **285**, 31774–31782 (2010).
194. Kawamata, N. *et al.* Genetic profiling of myeloproliferative disorders by single-nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray. *Exp. Hematol.* **36**, 1471–9 (2008).
195. Dawson, M. A. *et al.* JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature* **461**, 819–822 (2009).
196. Liu, F. *et al.* JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell* **19**, 283–294 (2011).
197. Girodon, F., Steinkamp, M. P., Cleyrat, C., Hermouet, S. & Wilson, B. S. Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood* **118**, 2633–2634 (2011).
198. Plo, I. *et al.* JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* **112**, 1402–1412 (2008).
199. Nakatake, M. *et al.* JAK2V617F negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* **31**, 1323–1333 (2012).
200. Chen, E. *et al.* JAK2V617F promotes replication fork stalling with disease-restricted impairment of the intra-S checkpoint response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 15190–15195 (2014).
201. Moliterno, A. R., Williams, D. M., Rogers, O., Isaacs, M. A. & Spivak, J. L. Phenotypic variability within the JAK2 V617F-positive MPD: roles of progenitor cell and neutrophil allele burdens. *Exp. Hematol.* **36**, 1480–6 (2008).
202. Tiedt, R. *et al.* Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* **111**, 3931–3940 (2008).
203. Teofili, L. *et al.* Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood* **110**, 354–359 (2007).
204. Kirito, K. *et al.* A functional role of Stat3 in in vivo megakaryopoiesis. *Blood* **99**, 3220–7 (2002).
205. Murray, P. J. STAT3-mediated anti-inflammatory signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1028–1031 (2006).
206. Pardanani, A., Fridley, B. L., Lasho, T. L., Gilliland, D. G. & Tefferi, A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* **111**, 2785–2789 (2008).
207. Rumi, E. & Cazzola, M. Advances in understanding the pathogenesis of familial myeloproliferative neoplasms. *Br. J. Haematol.* **178**, 689–698 (2017).
208. Zaleskas, V. M. *et al.* Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. *PLoS One* **1**, e18 (2006).
209. Wernig, G. *et al.* Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* **107**, 4274–4281 (2006).
210. Godfrey, A. L. *et al.* Clonal analyses reveal associations of JAK2V617F homozygosity with hematologic features, age and gender in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* **98**, 718–721 (2013).
211. Kralovics, R. *et al.* Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood* **108**, 1377–1380 (2006).
212. Kiladjan, J.-J. *et al.* Essential thrombocythemias without V617F JAK2 mutation are clonal hematopoietic stem cell disorders. *Leukemia* **20**, 1181–1183 (2006).
213. Theocharides, A. *et al.* Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* **110**, 375–379 (2007).
214. Kilpivaara, O. *et al.* A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 455–9 (2009).
215. Olcaydu, D. *et al.* A common JAK2 haplotype confers susceptibility to myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 450–4 (2009).
216. Jones, A. V. *et al.* JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 446–449 (2009).
217. Bellanne-Chantelot, C. *et al.* Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* **108**, 346–352 (2006).

218. Landgren, O. *et al.* Increased risks of polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myelofibrosis among 24 577 first-degree relatives of 11 039 patients with myeloproliferative neoplasms in Sweden. *Blood* **112**, 2199–2204 (2008).
219. Cario, H., Goerttler, P. S., Steimle, C., Levine, R. L. & Pahl, H. L. The JAK2V617F mutation is acquired secondary to the predisposing alteration in familial polycythaemia vera. *Br. J. Haematol.* **130**, 800–801 (2005).
220. Ellgaard, L. & Frickel, E.-M. Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem. Biophys.* **39**, 223–47 (2003).
221. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–29 (2003).
222. Bedard, K., Szabo, E., Michalak, M. & Opas, M. Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int. Rev. Cytol.* **245**, 91–121 (2005).
223. Michalak, M., Groenendyk, J., Szabo, E., Gold, L. I. & Opas, M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **417**, 651–666 (2009).
224. Li, Z., Stafford, W. F. & Bouvier, M. The Metal Ion Binding Properties of Calreticulin Modulate Its Conformational Flexibility and Thermal Stability †. *Biochemistry* **40**, 11193–11201 (2001).
225. Villamil Giraldo, A. M. *et al.* The structure of calreticulin C-terminal domain is modulated by physiological variations of calcium concentration. *J. Biol. Chem.* **285**, 4544–53 (2010).
226. Ellgaard, L. *et al.* Three-dimensional structure topology of the calreticulin P-domain based on NMR assignment. *FEBS Lett.* **488**, 69–73 (2001).
227. Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M. A. & Williams, D. B. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* **37**, 3480–90 (1998).
228. Araki, M. *et al.* Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127**, 1307–1316 (2016).
229. Balligand, T. *et al.* Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia* **30**, 1775–8 (2016).
230. Nivarthi, H. *et al.* Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants. *Leukemia* **30**, 1759–1763 (2016).
231. Rampal, R. *et al.* Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* **123**, e123–e133 (2014).
232. Kollmann, K. *et al.* A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation. *Leukemia* **31**, 934–944 (2017).
233. Chachoua, I. *et al.* Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* **127**, 1325–1335 (2016).
234. Vannucchi, A. M. *et al.* Calreticulin mutation-specific immunostaining in myeloproliferative neoplasms: pathogenetic insight and diagnostic value. *Leukemia* **28**, 1811–1818 (2014).
235. Pietra, D. *et al.* Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **30**, 431–438 (2016).
236. Garbati, M. R. *et al.* Mutant calreticulin-expressing cells induce monocyte hyperreactivity through a paracrine mechanism. *Am. J. Hematol.* **91**, 211–9 (2016).
237. Han, L. *et al.* Calreticulin-mutant proteins induce megakaryocytic signaling to transform hematopoietic cells and undergo accelerated degradation and Golgi-mediated secretion. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 45 (2016).
238. Daitoku, S. *et al.* Calreticulin mutation does not contribute to disease progression in essential thrombocythemia by inhibiting phagocytosis. *Exp. Hematol.* **44**, 817–825.e3 (2016).
239. Tefferi, A. & Vainchenker, W. Myeloproliferative Neoplasms: Molecular Pathophysiology, Essential Clinical Understanding, and Treatment Strategies. *J. Clin. Oncol.* **29**, 573–582 (2011).
240. Jensen, M. K., de Nully Brown, P., Nielsen, O. J. & Hasselbalch, H. C. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur. J. Haematol.* **65**, 132–9 (2000).
241. Alvarez-Larran, A. *et al.* Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood* **116**, 1205–1210 (2010).
242. Cortelazzo, S. *et al.* Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **332**, 1132–6 (1995).
243. Beer, P. A., Erber, W. N., Campbell, P. J. & Green, A. R. How I treat essential thrombocythemia. *Blood* **117**, 1472–1482 (2011).
244. Campbell, P. J. *et al.* Reticulin Accumulation in Essential Thrombocythemia: Prognostic Significance and Relationship to Therapy. *J. Clin. Oncol.* **27**, 2991–2999 (2009).

245. Harrison, C. N. *et al.* Hydroxyurea Compared with Anagrelide in High-Risk Essential Thrombocythemia. *N. Engl. J. Med.* **353**, 33–45 (2005).
246. Shvidel, L. *et al.* Busulphan is safe and efficient treatment in elderly patients with essential thrombocythemia. *Leukemia* **21**, 2071–2072 (2007).
247. Crisà, E. *et al.* A retrospective study on 226 polycythemia vera patients: impact of median hematocrit value on clinical outcomes and survival improvement with anti-thrombotic prophylaxis and non-alkylating drugs. *Ann. Hematol.* **89**, 691–9 (2010).
248. Barosi, G. *et al.* Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood* **113**, 4829–4833 (2009).
249. Marchioli, R. *et al.* Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. *N. Engl. J. Med.* **368**, 22–33 (2013).
250. Landolfi, R. *et al.* Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **350**, 114–24 (2004).
251. Verstovsek, S. *et al.* A phase 2 study of ruxolitinib, an oral JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with advanced polycythemia vera who are refractory or intolerant to hydroxyurea. *Cancer* **120**, 513–520 (2014).
252. Treatment of polycythaemia vera by radiophosphorus or busulphan: a randomized trial. "Leukemia and Hematosarcoma" Cooperative Group, European Organization for Research on Treatment of Cancer (E.O.R.T.C.). *Br. J. Cancer* **44**, 75–80 (1981).
253. Kiladjian, J.-J., Chevret, S., Dosquet, C., Chomienne, C. & Rain, J.-D. Treatment of Polycythemia Vera With Hydroxyurea and Pipobroman: Final Results of a Randomized Trial Initiated in 1980. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3907–3913 (2011).
254. Kroger, N. *et al.* Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. *Blood* **125**, 3347–3350 (2015).
255. Barbui, T. *et al.* Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *J. Clin. Oncol.* **29**, 761–770 (2011).
256. Mesa, R. A. *et al.* A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* **101**, 2534–2541 (2003).
257. Tefferi, A. *et al.* Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia* **21**, 1827–1828 (2007).
258. Tefferi, A. *et al.* Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* **108**, 1158–1164 (2006).
259. Martínez-Trillos, A. *et al.* Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Ann. Hematol.* **89**, 1233–7 (2010).
260. Mishchenko, E. & Tefferi, A. Treatment options for hydroxyurea-refractory disease complications in myeloproliferative neoplasms: JAK2 inhibitors, radiotherapy, splenectomy and transjugular intrahepatic portosystemic shunt. *Eur. J. Haematol.* **85**, 192–9 (2010).
261. Koppikar, P. *et al.* Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature* **489**, 155–9 (2012).
262. Meyer, S. C. & Levine, R. L. Molecular Pathways: Molecular Basis for Sensitivity and Resistance to JAK Kinase Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2051–2059 (2014).
263. Andraos, R. *et al.* Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent. *Cancer Discov.* **2**, 512–523 (2012).
264. Meyer, S. C. *et al.* CHZ868, a Type II JAK2 Inhibitor, Reverses Type I JAK Inhibitor Persistence and Demonstrates Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell* **28**, 15–28 (2015).
265. Quintas-Cardama, A. *et al.* Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115**, 3109–3117 (2010).
266. Kubovcakova, L. *et al.* Differential effects of hydroxyurea and INC424 on mutant allele burden and myeloproliferative phenotype in a JAK2-V617F polycythemia vera mouse model. *Blood* **121**, 1188–99 (2013).
267. Lin, Q. *et al.* Enantioselective Synthesis of Janus Kinase Inhibitor INCB018424 via an Organocatalytic Aza-Michael Reaction. *Org. Lett.* **11**, 1999–2002 (2009).
268. Tefferi, A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood* **119**, 2721–2730 (2012).
269. Tremblay, D., Marcellino, B. & Mascarenhas, J. Pharmacotherapy of Myelofibrosis. *Drugs* **77**, 1549–1563 (2017).

270. Verstovsek, S. *et al.* Efficacy, safety and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 2-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica* **98**, 1865–1871 (2013).
271. Vannucchi, A. M. *et al.* A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. *Haematologica* **100**, 1139–1145 (2015).
272. Bose, P. & Verstovsek, S. JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms: what is next? *Blood* **130**, 115–125 (2017).
273. Wernig, G. *et al.* Efficacy of TG101348, a Selective JAK2 Inhibitor, in Treatment of a Murine Model of JAK2V617F-Induced Polycythemia Vera. *Cancer Cell* **13**, 311–320 (2008).
274. Deburme, F. *et al.* JAK2 inhibition has different therapeutic effects according to myeloproliferative neoplasm development in mice. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 2564–74 (2015).
275. Pardanani, A. *et al.* Safety and Efficacy of TG101348, a Selective JAK2 Inhibitor, in Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789–796 (2011).
276. Harrison, C. N. *et al.* Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol.* **4**, e317–e324 (2017).
277. Jamieson, C. *et al.* Effect of treatment with a JAK2-selective inhibitor, fedratinib, on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J. Transl. Med.* **13**, 294 (2015).
278. Pardanani, A. *et al.* Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis. *JAMA Oncol.* **1**, 643 (2015).
279. Tyner, J. W. *et al.* CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115**, 5232–5240 (2010).
280. Pardanani, A. *et al.* Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia* **27**, 1322–1327 (2013).
281. Mesa, R. A. *et al.* SIMPLIFY-1: A Phase III Randomized Trial of Momelotinib Versus Ruxolitinib in Janus Kinase Inhibitor-Naïve Patients With Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **35**, 3844–3850 (2017).
282. Ma, L. *et al.* Discovery and characterization of LY2784544, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor of JAK2V617F. *Blood Cancer J.* **3**, e109–e109 (2013).
283. Verstovsek, S. *et al.* A phase 1 study of the Janus kinase 2 (JAK2) V617F inhibitor, gandotinib (LY2784544), in patients with primary myelofibrosis, polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Leuk. Res.* **61**, 89–95 (2017).
284. Verstovsek, S. *et al.* Phase 1/2 study of pacritinib, a next generation JAK2/FLT3 inhibitor, in myelofibrosis or other myeloid malignancies. *J. Hematol. Oncol.* **9**, 137 (2016).
285. Purandare, A. V *et al.* Characterization of BMS-911543, a functionally selective small-molecule inhibitor of JAK2. *Leukemia* **26**, 280–8 (2012).
286. Wan, H. *et al.* Discovery of a Highly Selective JAK2 Inhibitor, BMS-911543, for the Treatment of Myeloproliferative Neoplasms. *ACS Med. Chem. Lett.* **6**, 850–855 (2015).
287. Verstovsek, S. *et al.* A phase I, open-label, dose-escalation, multicenter study of the JAK2 inhibitor NS-018 in patients with myelofibrosis. *Leukemia* **31**, 393–402 (2017).
288. Weigert, O. *et al.* Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *J. Exp. Med.* **209**, 259–73 (2012).
289. Amaru Calzada, A. *et al.* The HDAC inhibitor Givinostat modulates the hematopoietic transcription factors NFE2 and C-MYB in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm cells. *Exp. Hematol.* **40**, 634–645.e10 (2012).
290. Rambaldi, A. *et al.* A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *Br. J. Haematol.* **150**, no-no (2010).
291. Wang, Y. *et al.* Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells. *Blood* **114**, 5024–5033 (2009).
292. Marubayashi, S. *et al.* HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 3578–93 (2010).
293. Schmitt, E. *et al.* Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res.* **63**, 8233–40 (2003).
294. Sevin, M. *et al.* HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis. *Nat. Commun.* **9**, 1431 (2018).
295. Tefferi, A. *et al.* Pomalidomide Is Active in the Treatment of Anemia Associated With Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **27**, 4563–4569 (2009).
296. Begna, K. H. *et al.* A phase-2 trial of low-dose pomalidomide in myelofibrosis. *Leukemia* **25**, 301–304 (2011).

297. Tefferi, A. *et al.* A randomized study of pomalidomide vs placebo in persons with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis and RBC-transfusion dependence. *Leukemia* **31**, 896–902 (2017).
298. Hornung, V. *et al.* AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* **458**, 514–518 (2009).
299. Pichlmair, A. *et al.* RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* **314**, 997–1001 (2006).
300. Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K. & Chen, Z. J. Identification and Characterization of MAVS, a Mitochondrial Antiviral Signaling Protein that Activates NF- κ B and IRF3. *Cell* **122**, 669–682 (2005).
301. Schoggins, J. W. *et al.* A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* **472**, 481–485 (2011).
302. Lerner, A. C., Chaudhuri, A. & Darnell, J. E. Transcriptional induction by interferon. New protein(s) determine the extent and length of the induction. *J. Biol. Chem.* **261**, 453–9 (1986).
303. Malakhov, M. P., Malakhova, O. A., Kim, K. II, Ritchie, K. J. & Zhang, D.-E. UBP43 (USP18) Specifically Removes ISG15 from Conjugated Proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 9976–9981 (2002).
304. François-Newton, V. *et al.* USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response. *PLoS One* **6**, e22200 (2011).
305. Paquette, R. *et al.* Interferon- α induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo. *Leukemia* **16**, 1484–1489 (2002).
306. Dengler, R. *et al.* Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells. *Br. J. Haematol.* **89**, 250–7 (1995).
307. Molldrem, J. J. *et al.* Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nat. Med.* **6**, 1018–23 (2000).
308. Kanodia, S. *et al.* PR1-specific T cells are associated with unmaintained cytogenetic remission of chronic myelogenous leukemia after interferon withdrawal. *PLoS One* **5**, e11770 (2010).
309. Xiong, Z. *et al.* Novel tumor antigens elicit anti-tumor humoral immune reactions in a subset of patients with polycythemia vera. *Clin. Immunol.* **122**, 279–287 (2007).
310. Arshad, N. & Cresswell, P. Tumor-associated calreticulin variants functionally compromise the peptide loading complex and impair its recruitment of MHC-I. *J. Biol. Chem.* **293**, 9555–9569 (2018).
311. Kovacsovic-Bankowski, M. *et al.* Changes in peripheral blood lymphocytes in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients treated with pegylated-interferon alpha and correlation with JAK2V617F allelic burden. *Exp. Hematol. Oncol.* **5**, 28 (2015).
312. Indraccolo, S. Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. *Autoimmunity* **43**, 244–7 (2010).
313. Di Raimondo, F., Palumbo, G. A., Molica, S. & Giustolisi, R. Angiogenesis in chronic myeloproliferative diseases. *Acta Haematol.* **106**, 177–83 (2001).
314. Sangfelt, O., Erickson, S., Einhorn, S. & Grandér, D. Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon- α in hematopoietic cell lines. *Oncogene* **14**, 415–423 (1997).
315. Ahmad, S., Alsayed, Y. M., Druker, B. J. & Plataniias, L. C. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of the CrkL adaptor protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 29991–4 (1997).
316. Plataniias, L. C. *et al.* CrkL and CrkII participate in the generation of the growth inhibitory effects of interferons on primary hematopoietic progenitors. *Exp. Hematol.* **27**, 1315–21 (1999).
317. Yamane, A. *et al.* Interferon-2b-induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. *Blood* **112**, 542–550 (2008).
318. Aman, M. J. *et al.* Regulation of cytokine expression by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells: inhibition of hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist. *Blood* **84**, 4142–50 (1994).
319. Castello, G. *et al.* The in vitro and in vivo effect of recombinant interferon alpha-2a on circulating haemopoietic progenitors in polycythaemia vera. *Br. J. Haematol.* **87**, 621–3 (1994).
320. Lu, M. *et al.* Interferon-alpha targets JAK2V617F-positive hematopoietic progenitor cells and acts through the p38 MAPK pathway. *Exp. Hematol.* **38**, 472–80 (2010).
321. Essers, M. A. G. *et al.* IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* **458**, 904–908 (2009).
322. Sato, T. *et al.* Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. *Nat. Med.* **15**, 696–700 (2009).

323. Pietras, E. M. *et al.* Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *J. Exp. Med.* **211**, 245–62 (2014).
324. Hasan, S. *et al.* JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN. *Blood* **122**, 1464–1477 (2013).
325. Mullally, A. *et al.* Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- in a murine model of polycythemia vera. *Blood* **121**, 3692–3702 (2013).
326. Jewell, A. P. *et al.* Interferon-alpha up-regulates bcl-2 expression and protects B-CLL cells from apoptosis in vitro and in vivo. *Br. J. Haematol.* **88**, 268–74 (1994).
327. Rodríguez-Villanueva, J. & McDonnell, T. J. Induction of apoptotic cell death in non-melanoma skin cancer by interferon-alpha. *Int. J. cancer* **61**, 110–4 (1995).
328. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**, 237–49 (2003).
329. Mehrotra, S. *et al.* Essential Role for the Mnk Pathway in the Inhibitory Effects of Type I Interferons on Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Precursors. *J. Biol. Chem.* **288**, 23814–23822 (2013).
330. Lu, M., Xia, L., Li, Y., Wang, X. & Hoffman, R. The orally bioavailable MDM2 antagonist RG7112 and pegylated interferon 2a target JAK2V617F-positive progenitor and stem cells. *Blood* **124**, 771–779 (2014).
331. Plo, I. p53 at the crossroads of MPN treatment. *Blood* **124**, 668–669 (2014).
332. Lu, M. *et al.* Treatment with the Bcl-xL inhibitor ABT-737 in combination with interferon specifically targets JAK2V617F-positive polycythemia vera hematopoietic progenitor cells. *Blood* **116**, 4284–4287 (2010).
333. Thyrell, L. *et al.* Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **279**, 24152–62 (2004).
334. Talpaz, M. *et al.* Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **69**, 1280–8 (1987).
335. Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia *et al.* Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **330**, 820–5 (1994).
336. O'Brien, S. G. *et al.* Imatinib Compared with Interferon and Low-Dose Cytarabine for Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* **348**, 994–1004 (2003).
337. Hochhaus, A. *et al.* Dasatinib-associated major molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase following imatinib failure: response dynamics and predictive value. *Leukemia* **23**, 1628–1633 (2009).
338. Preudhomme, C. *et al.* Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **363**, 2511–21 (2010).
339. Burchert, A. *et al.* Sustained molecular response with interferon alfa maintenance after induction therapy with imatinib plus interferon alfa in patients with chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1429–35 (2010).
340. Silver, R. T. Recombinant interferon-alpha for treatment of polycythaemia vera. *Lancet (London, England)* **2**, 403 (1988).
341. Bellucci, S., Harousseau, J. L., Brice, P. & Tobelem, G. Treatment of essential thrombocythaemia by alpha 2a interferon. *Lancet (London, England)* **2**, 960–1 (1988).
342. Giles, F. J. *et al.* Alpha-interferon therapy for essential thrombocythaemia. *Lancet (London, England)* **2**, 70–2 (1988).
343. Liu, E. *et al.* Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* **101**, 3294–3301 (2003).
344. Massaro, P. *et al.* Polycythemia vera treated with recombinant interferon-alpha 2a: evidence of a selective effect on the malignant clone. *Am. J. Hematol.* **56**, 126–8 (1997).
345. Messora, C. *et al.* Cytogenetic conversion in a case of polycythaemia vera treated with interferon-alpha. *Br. J. Haematol.* **86**, 402–4 (1994).
346. Hino, M. *et al.* Possible selective effects of interferon alpha-2b on a malignant clone in a case of polycythemia vera. *Ann. Hematol.* **66**, 161–2 (1993).
347. Kiladjan, J.-J. *et al.* Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* **112**, 3065–3072 (2008).
348. Quintas-Cardama, A. *et al.* Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon -2a. *Blood* **122**, 893–901 (2013).

349. Masarova, L. *et al.* Pegylated interferon alfa-2a in patients with essential thrombocythaemia or polycythaemia vera: a post-hoc, median 83 month follow-up of an open-label, phase 2 trial. *Lancet. Haematol.* **4**, e165–e175 (2017).
350. Quintás-Cardama, A. *et al.* Pegylated Interferon Alfa-2a Yields High Rates of Hematologic and Molecular Response in Patients With Advanced Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5418–5424 (2009).
351. Kiladjian, J.-J. *et al.* Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon α -2a treatment targets JAK2 V617F clones without affecting TET2 mutant cells. *Leukemia* **24**, 1519–1523 (2010).
352. Verger, E. *et al.* Clinical and molecular response to interferon- therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood* **126**, 2585–2591 (2015).
353. Kjær, L. *et al.* Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment. *PLoS One* **11**, e0165336 (2016).
354. Ianotto, J.-C. *et al.* PEG-IFN-alpha-2a therapy in patients with myelofibrosis: a study of the French Groupe d'Etudes des Myelofibroses (GEM) and France Intergroupe des syndromes Myéloprolifératifs (FIM). *Br. J. Haematol.* **146**, 223–5 (2009).
355. Silver, R. T. & Vandris, K. Recombinant interferon alpha (rIFN α -2b) may retard progression of early primary myelofibrosis. *Leukemia* **23**, 1366–1369 (2009).
356. Hasan, S. *et al.* Use of the 46/1 haplotype to model JAK2 V617F clonal architecture in PV patients: clonal evolution and impact of IFN α treatment. *Leukemia* **28**, 460–463 (2014).
357. Ishii, T. *et al.* Recurrence of clonal hematopoiesis after discontinuing pegylated recombinant interferon- α 2a in a patient with polycythemia vera. *Leukemia* **21**, 373–374 (2007).
358. Nussenzveig, R. H. *et al.* Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation. *Exp. Hematol.* **35**, 32.e1–32.e9 (2007).
359. Kiladjian, J.-J. *et al.* Long-term incidence of hematological evolution in three French prospective studies of hydroxyurea and pipobroman in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin. Thromb. Hemost.* **32**, 417–21 (2006).
360. McMullin, M. F. *et al.* Guidelines for the diagnosis, investigation and management of polycythaemia/erythrocytosis. *Br. J. Haematol.* **130**, 174–195 (2005).
361. Zhao, X. *et al.* Brief Report: Interferon- γ Induces Expansion of Lin⁻ Sca-1⁺ C-Kit⁺ Cells. *Stem Cells* **28**, 122–126 (2010).
362. Baldrige, M. T., King, K. Y., Boles, N. C., Weksberg, D. C. & Goodell, M. A. Quiescent haematopoietic stem cells are activated by IFN- γ in response to chronic infection. *Nature* **465**, 793–797 (2010).
363. De Bruin, A. M., Demirel, O., Hooibrink, B., Brandts, C. H. & Nolte, M. A. Interferon- impairs proliferation of hematopoietic stem cells in mice. *Blood* **121**, 3578–3585 (2013).
364. Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D. & Alexander, W. S. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1195–200 (1998).
365. Richards, M. K., Liu, F., Iwasaki, H., Akashi, K. & Link, D. C. Pivotal role of granulocyte colony-stimulating factor in the development of progenitors in the common myeloid pathway. *Blood* **102**, 3562–3568 (2003).
366. Huber, J. P. & David Farrar, J. Regulation of effector and memory T-cell functions by type I interferon. *Immunology* **132**, 466–474 (2011).
367. Lindgren, M. *et al.* Genetic variation in IL28B (IFNL3) and response to interferon-alpha treatment in myeloproliferative neoplasms. *Eur. J. Haematol.* **100**, 419–425 (2018).

Annexes

- Plo I, Bellanné-Chantelot C, Mosca M, Mazzi S, Marty C, Vainchenker W. *Genetic alterations of the TPO/MPL/JAK2 axis impacting megakaryopoiesis. **Frontiers in Endocrinology**, 2017.*
- Bellanné-Chantelot C, Mosca M, Marty C, Favier R, Vainchenker W, Plo I. *Identification of MPL R102P heterozygous mutation in hereditary thrombocytosis. **Frontiers in Endocrinology**, 2017.*

Contribution personnelle dans les figures de la revue et de l'article, ainsi que dans l'isolement des cellules mononucléées (CMN) du sang total et dans l'extraction d'ADN des patients.

- Sevin M, Kubovcakova L, Pernet N, Causse S, Vitte F, Villeval JL, Lacout C, Cordonnier M, Rodrigues-Lima F, Chanteloup G, Mosca M, Chrétien ML, Bastie JN, Audia S, Sagot P, Ramla S, Martin L, Gleave M, Mezger V, Skoda R, Plo I, Garrido C, Girodon F, de Thonel A. *HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis. **Nature Communication**, 2018.*

Contribution personnelle dans l'étude de l'effet du SH HSP27 sur les colonies érythroïdes (supplemental data): génotypage de JAK2 des colonies érythroïdes et compte des progéniteurs hématopoïétiques.



Genetic Alterations of the Thrombopoietin/MPL/JAK2 Axis Impacting Megakaryopoiesis

Isabelle Plo^{1,2,3}, Christine Bellanné-Chantelot^{1,4}, Matthieu Mosca^{1,2,3}, Stefania Mazzi^{1,2,5}, Caroline Marty^{1,2,3} and William Vainchenker^{1,2,3*}

¹INSERM UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif, France, ²Université Paris-Saclay, UMR1170, Gustave Roussy, Villejuif, France, ³Gustave Roussy, UMR1170, Villejuif, France, ⁴Department of Genetics, AP-HP Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière - Charles Foix, UPMC Univ Paris 06, Paris, France, ⁵Université Paris-Diderot, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Pierre De Meyts,
de Duve Institute, Belgium

Reviewed by:

Jean-Baptiste Demoulin,
Catholic University of
Louvain, Belgium
James M. Murphy,
Walter and Eliza Hall Institute of
Medical Research, Australia

*Correspondence:

William Vainchenker
verpre@igr.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 30 June 2017

Accepted: 28 August 2017

Published: 12 September 2017

Citation:

Plo I, Bellanné-Chantelot C,
Mosca M, Mazzi S, Marty C and
Vainchenker W (2017) Genetic
Alterations of the Thrombopoietin/
MPL/JAK2 Axis Impacting
Megakaryopoiesis.
Front. Endocrinol. 8:234.
doi: 10.3389/fendo.2017.00234

Megakaryopoiesis is an original and complex cell process which leads to the formation of platelets. The homeostatic production of platelets is mainly regulated and controlled by thrombopoietin (TPO) and the TPO receptor (MPL)/JAK2 axis. Therefore, any hereditary or acquired abnormality affecting this signaling axis can result in thrombocytosis or thrombocytopenia. Thrombocytosis can be due to genetic alterations that affect either the intrinsic MPL signaling through gain-of-function (GOF) activity (*MPL*, *JAK2*, *CALR*) and loss-of-function (LOF) activity of negative regulators (*CBL*, *LNK*) or the extrinsic MPL signaling by *THPO* GOF mutations leading to increased TPO synthesis. Alternatively, thrombocytosis may paradoxically result from mutations of *MPL* leading to an abnormal MPL trafficking, inducing increased TPO levels by alteration of its clearance. In contrast, thrombocytopenia can also result from LOF *THPO* or *MPL* mutations, which cause a complete defect in MPL trafficking to the cell membrane, impaired MPL signaling or stability, defects in the TPO/MPL interaction, or an absence of TPO production.

Keywords: thrombopoietin, MPL, JAK2, MPLR102P, thrombocytosis, thrombocytopenia

INTRODUCTION

Megakaryopoiesis is an original cell process which leads to the formation of platelets. The homeostatic production of platelets is mainly regulated by thrombopoietin (TPO) and the TPO receptor (MPL)/JAK2 axis. TPO regulates nearly all stages of the megakaryocyte (MK) differentiation, and this explains that numerous diseases characterized by an alteration in MK/platelet production leading to thrombocytopenia or thrombocytosis are due to either acquired or hereditary mutations in *MPL*, *THPO*, or *JAK2*.

IMPORTANCE OF THE TPO/MPL/JAK2 AXIS IN MEGAKARYOPOIESIS

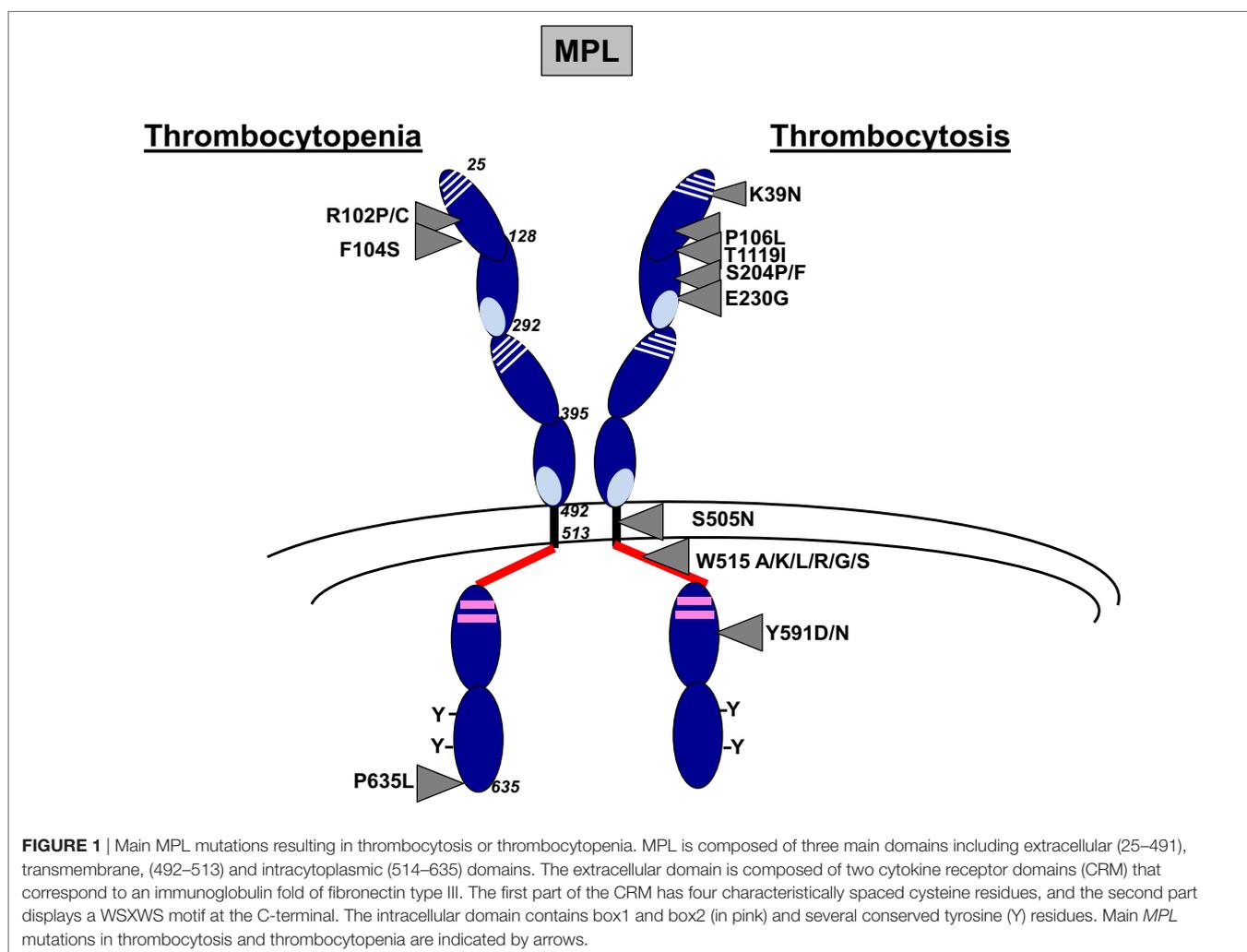
Megakaryopoiesis

Megakaryopoiesis is the process leading to the differentiation of bone marrow progenitors to MKs, giving rise to circulating platelets in the blood. The first step requires the commitment of a multipotent hematopoietic stem cell (HSC) to an MK progenitor followed by several proliferation

and differentiation steps (1). There is increasing evidence that MK progenitors may arise directly from an HSC or from a MK/erythroid progenitor (2). This may explain that numerous transcription factors such as TAL1, GATA2, ERG/FLI-1, and RUNX1 regulate HSC properties and MK differentiation and that others, such as GATA1 and GFI1b, regulate also erythroid and MK differentiations. Moreover, TPO plays a central role not only in the MK/platelet lineage but also in HSCs (3). MK progenitors first proliferate before switching to endomitosis, which is a mitosis without cytokinesis (4). Polyploidization generates MKs with a modal distribution with a major peak at 16N. MKs further mature by increasing their cytoplasm and membrane to finally fragment to give rise to platelets. The fragmentation is a dynamic and regulated process. In the human adult, most of megakaryopoiesis takes place in the bone marrow, except the platelet release. Either MKs will send long pseudopods (proplatelets) through the endothelial barrier that will fragment into platelets in the blood flow (5) or the entire MKs will migrate into the circulation to fragment into platelets inside the lung microcirculation (6). It has also been underscored that mouse megakaryopoiesis may occur in the parenchymal lung (6).

TPO/MPL/JAK2 Axis

MPL is located on chromosome 1p34 and consists of 12 exons which encodes a protein of 70 kDa predicted weight (3). In human, MPL expression increases during megakaryopoiesis from HSCs and progenitors to MKs and platelets (7). MPL is a homodimeric class I receptor with three main domains: extracellular, transmembrane, and intracellular (**Figure 1**). The extracellular domain is composed of two consecutive cytokine receptor motifs composed of a fibronectin-III-like domain characterized by four conserved cysteine residues and a WSXWS motif. The transmembrane domain folds as an α -helix that is necessary for the insertion of the receptor in the membrane and is followed by a juxtamembrane or amphipathic domain composed of the RWQFP sequence (8). The intracellular domain is required to mediate the signaling through its binding *via* box1 to Janus tyrosine kinase JAK2 (9, 10). JAK2 was shown to be essential for MPL phosphorylation and for activation of downstream signaling pathways. TYK2, another member of the JAK family, can bind to MPL but can be activated by TPO only in the presence of JAK2. Thus, TYK2 was shown to be neither necessary nor sufficient for MPL phosphorylation and signaling (9).



The ligand of MPL is the glycoprotein hormone TPO encoded by the *THPO* gene at chromosome 3q27.1 and composed of five coding exons. It is organized in two domains: an N-terminal cytokine domain including the first 153 amino acids followed by a highly glycosylated C-terminal domain that regulates its production and increases its half-life *in vivo* (11) (Figure 2A). TPO is constitutively produced by the liver (12). However, its level is regulated by clearance through the platelet mass (13, 14) and its synthesis by inflammation. Kidney, spleen, and bone marrow have been found to contribute to the production of TPO at a lesser extent (12). It has been suggested that the TPO produced by bone marrow stromal cells and eventually MKs play a central role in the regulation of HSC quiescence. TPO synthesis in the liver can be regulated during inflammatory conditions by stimulation of IL-6 (15). Moreover, old desialylated platelets can bind to the Ashwell–Morell receptor on hepatocytes to induce TPO gene expression through activation of the JAK/STAT3 pathway *via* IL-6 receptor activation (16).

MPL is pre-associated with JAK2 and TYK2 in the endoplasmic reticulum. The two kinases play a role of chaperone

molecules and increase MPL trafficking to the cell membrane (17). The MPL/JAK2 complex becomes mature through traffic in the Golgi apparatus, where MPL undergoes successive glycosylations on asparagine residues (N-glycosylations) and is addressed at cell surface as a partially pre-dimerized receptor. TPO binding to MPL involves not only two main residues, D261 and L265, on the extracellular domain of MPL but also a site close to residue F104 (18, 19) and induces an increased dimerization of MPL and its stabilization. TPO binding induces conformational changes of MPL, which move closer the intracellular domains of the homodimer and position the two associated JAK2/TYK2 in proximity leading to their transphosphorylation (20). Active JAK2 phosphorylates several conserved tyrosine residues in the intracellular domain of MPL, which serve as docking sites for a number of substrates including STAT1, STAT3, and STAT5 and adaptors such as CBL, VAV, and SHC leading to activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT (21). After MPL activation, the TPO/MPL/JAK2 is internalized to either be recycled or, more often, degraded through proteasomes and lysosomes induced after

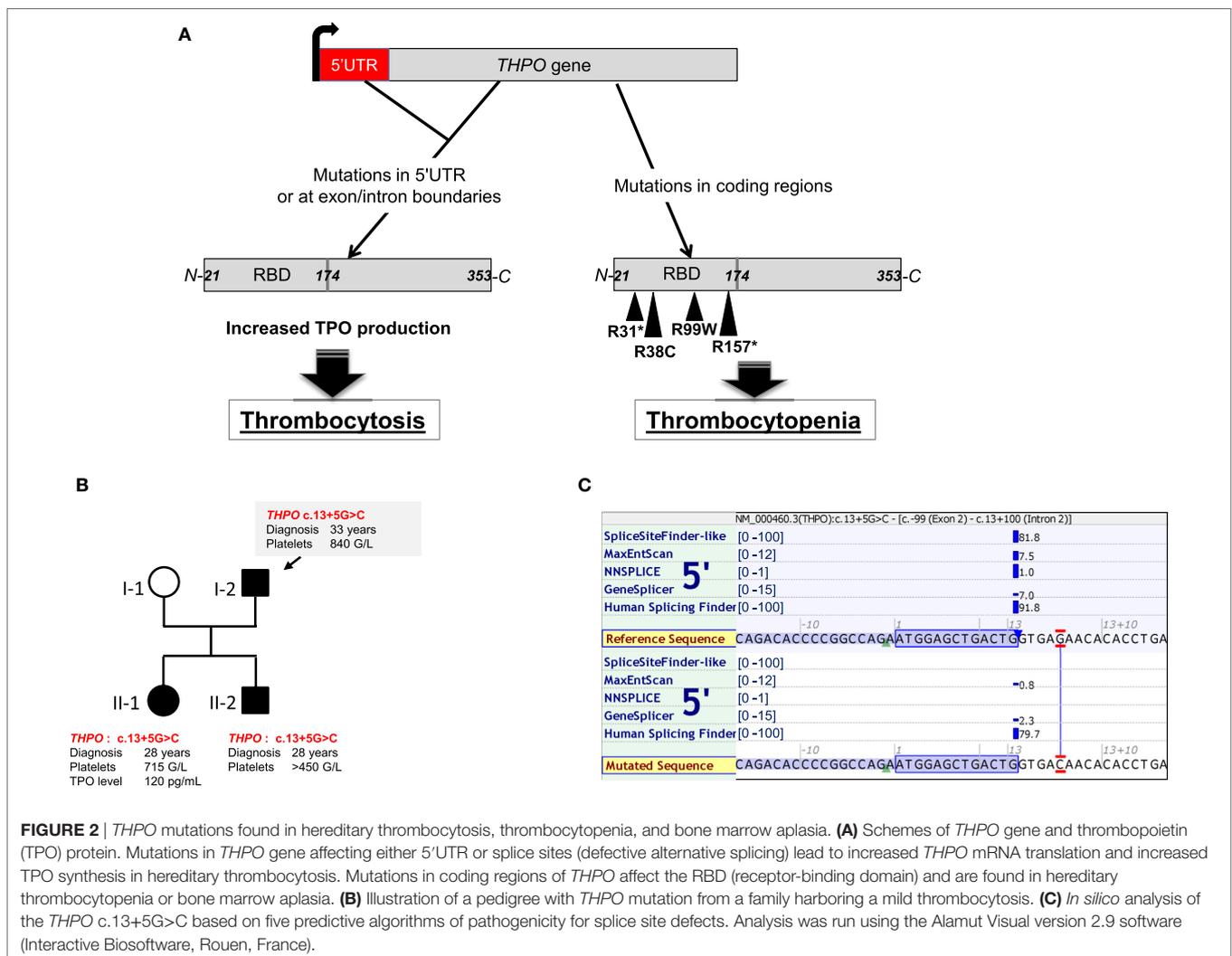


FIGURE 2 | *THPO* mutations found in hereditary thrombocytosis, thrombocytopenia, and bone marrow aplasia. **(A)** Schemes of *THPO* gene and thrombopoietin (TPO) protein. Mutations in *THPO* gene affecting either 5'UTR or splice sites (defective alternative splicing) lead to increased *THPO* mRNA translation and increased TPO synthesis in hereditary thrombocytosis. Mutations in coding regions of *THPO* affect the RBD (receptor-binding domain) and are found in hereditary thrombocytopenia or bone marrow aplasia. **(B)** Illustration of a pedigree with *THPO* mutation from a family harboring a mild thrombocytosis. **(C)** *In silico* analysis of the *THPO* c.13+5G>C based on five predictive algorithms of pathogenicity for splice site defects. Analysis was run using the Alamut Visual version 2.9 software (Interactive Biosoftware, Rouen, France).

activation of negative regulators such as the ubiquitin ligase CBL (22). In addition, members of the SOCS family (SOCS1, SOCS2) bind to phosphorylated JAK2 and/or MPL and induce their degradation through the proteasome pathway (23). Furthermore, LNK, an adaptor protein that binds to JAK2, and other phosphatases can limit MPL activation (24). Finally, PIAS negatively regulates the JAK2/STAT pathway by directly inhibiting the binding of STAT to DNA or by causing sumoylation of STATs (25). This negative regulation plays a central role in limiting the stimulation of MPL.

TPO/MPL/JAK2 Axis As a Central Player in Megakaryopoiesis in Mice

The importance of the TPO/MPL/JAK2 axis in megakaryopoiesis is illustrated by several lines of evidence. Both the constitutive *thpo*^{-/-} and *mpl*^{-/-} knockout (KO) mice and the conditional *jak2* KO mice induced in adulthood after crossing them with transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre under SCL promoter showed marked alterations in the HSC compartment associated with a thrombocytopenia ($150\text{--}400 \times 10^9/\text{L}$) (26–28). Of note, *tyk2*^{-/-} KO mice did not harbor thrombocytopenia consistently with its dispensable role in MPL activation (29). The levels of TPO were highly elevated in mouse plasma from *mpl*^{-/-} and conditional *jak2*^{-/-} mice due to the loss of clearance by platelet mass through Mpl binding. The conditional *mpl* and *jak2* KO mice were also crossed with PF4-Cre transgenic mice, which allowed the deletion of *mpl* or *jak2* in MKs and platelets, thereby only in the late stages of megakaryopoiesis. In a counter-intuitive manner, these mice presented a strong thrombocytosis ($5,000\text{--}10,000 \times 10^9/\text{L}$) with normal TPO levels in the plasma (30, 31). Thrombocytosis in these models was explained by the stimulation of the MK progenitor proliferation still expressing Mpl. Therefore, these data showed that the proliferation of MK progenitors (first steps of megakaryopoiesis) is highly dependent on TPO in contrast to the platelet production from MKs. A strong thrombocytosis but with a partial defect in the HSC compartment was also observed in *mpl* transgenic mice performed in *mpl*^{-/-} context which leads to subnormal Mpl expression in maturing MKs and platelets. These models demonstrate that low levels of MPL in MK progenitors are sufficient to induce their proliferation and highlighted the importance of MPL expression level during megakaryopoiesis (32, 33).

EFFECT OF TPO/MPL/JAK2 AXIS ALTERATIONS IN THE STIMULATION OF MEGAKARYOPOIESIS

THPO/MPL/JAK2 gain-of-function (GOF) or loss-of-function (LOF) mutations as well as LOF mutations of negative regulators have been identified in diseases leading to MK hyperplasia (Table 1).

Mutations on the TPO/MPL/JAK2 Axis MPL Mutations

MPL mutations have been found in myeloproliferative neoplasms (MPNs) including essential thrombocythemia (ET) (3%) and

primary myelofibrosis (PMF) (5%) and in hereditary thrombocytosis (Figure 1). The main mutations in MPNs are located in the exon 10 of *MPL* and affect the tryptophan at position 515 leading to amino acid changes such as *MPL* W515K/L/A/G/S/R that show a GOF activity (42–46). The tryptophan at position 515 is part of the amphipathic domain located at the junction between the transmembrane and the cytoplasmic domains of MPL (RWQFP) and has been shown to prevent the dimerization of MPL in the absence of cytokine (8). Its substitution for leucine, lysine, arginine, or alanine leads to constitutive activation of the receptor (58). *MPL* W515L retroviral mouse model after bone marrow transplantation is characterized by a strong thrombocytosis followed by a myelofibrosis recapitulating what is observed in human setting (46). Moreover, a few acquired *MPL* mutations outside the exon 10, leading to amino acid changes in the extra- and intra-cytoplasmic domains of MPL (S204P/F, E230G, Y591D/N, T119I), have been more recently described in sporadic MPN cases. They have been demonstrated to show a lower GOF activity than *MPL* W515 mutants (59, 60). They could be associated with other acquired or constitutional molecular events, including *JAK2* mutations, to induce the disease phenotype. Finally, the *MPL* S505N mutation was initially described in familial cases of hereditary thrombocytosis, although it has also been described in sporadic cases of ET and PMF (44, 47, 61). S505 is localized in the transmembrane domain of the receptor and the mutation induces a constitutive dimerization of MPL in an active conformation (44).

Other very interesting *MPL* mutations affecting the extracellular domain of MPL (*MPL* P106L and *MPL* K39N) were discovered in hereditary thrombocytosis but are associated with high TPO levels in contrast to other *MPL* mutations.

MPL K39N (*MPL* Baltimore) was described as a polymorphism restricted to 7% of African Americans. Heterozygous cases present a mild thrombocytosis around $500 \times 10^9/\text{L}$ platelets, whereas homozygous cases showed around $800 \times 10^9/\text{L}$ platelets. It was shown that *MPL* K39N is expressed at low levels at the cell surface and in an incomplete maturation form suggesting a LOF mutation through an abnormal membrane expression of the receptor (48).

MPL P106L mutation was initially found in an Arab family, which segregates with strong thrombocytosis in homozygous cases suggesting autosomal recessive inheritance associated with high TPO levels (49). Sometimes, mild thrombocytosis was observed in heterozygous cases. Later on, it was reported that *MPL* P106L presents a defect in trafficking that prevents its translocation to the cell surface, but is still capable to bind TPO and to signal in the cytosol (62). This seems unlikely since the extracellular domain of MPL is localized in the lumen of endoplasmic reticulum. Our group has also identified such mutation in one Saudian and one Kuwaitian family harboring strong thrombocytosis cases with high TPO levels with autosomal recessive inheritance. We confirmed that *MPL* P106L presents a defect of trafficking, but we demonstrated that low levels of this mutant are addressed at the membrane of MK progenitors. Moreover, there was no spontaneous growth of MKs from patients while MKs, but not platelets, responded to TPO. This study also showed that *MPL* P106L was better localized at the cell surface on immature than on

TABLE 1 | Genetic alterations of the thrombopoietin (TPO)/MPL/JAK2 axis leading to thrombocytosis and thrombocytopenia.

Gene	Mutation	Somatic/ germline	Mechanism	Clinical phenotype	Reference
JAK2	V617F	Somatic	GOF Constitutive signaling	Thrombocytosis	(34–37)
	V617I Htz	Germline	GOF Low constitutive signaling	Thrombocytosis	(38)
	H608N Htz		GOF		(39)
	R564Q Htz		GOF		(40)
	[S755R.R938Q] Htz		GOF		(41)
	R867Q Htz		GOF		(41)
MPL	W515 A/K/L/R/G/S	Somatic	GOF Constitutive signaling	Thrombocytosis	(42–46)
	S505N^a		GOF		(47)
	S505N^a Htz	Germline	GOF Constitutive signaling	Thrombocytosis	(44)
	K39N Htz or Hmz		LOF Incomplete processing and reduction in MPL protein		(48)
	P106L Hmz		LOF Reduction in MPL protein and defect of TPO clearance by platelets		(49, 50)
	R102P Hmz or C-Htz	Germline	LOF Defective trafficking of MPL	Thrombocytopenia	(51)
	F104S Hmz or C-Htz		LOF Normal MPL trafficking, no binding to TPO		(52)
	P635L Hmz or C-Htz		LOF Impaired MPL stability and signaling		(51)
THPO	c.-31G>T Htz	Germline	GOF Increased synthesis of TPO	Thrombocytosis	(55)
	Splice site defects Htz: (c.13+1G>C, c.141+1G>C, c.141+5G>C)		GOF		(53, 54)
	R38C ^b Htz	Germline	LOF Impaired TPO binding to MPL	Thrombocytopenia	(11)
	R31 ^c Htz		LOF No synthesis of TPO		(56)
	R99W ^d Hmz		LOF Impaired TPO binding to MPL		(57)
R157 ^{ed} Hmz		LOF No synthesis of TPO		(57)	

GOF, gain-of-function; LOF, loss-of-function; Htz, heterozygous state; Hmz, homozygous state; C-Htz, compound heterozygous state.

^aMutation indicated in bold involved as somatic or germline event or implicated in both phenotypes.

^bAssociated with bone marrow failure at homozygous state.

^cAssociated with inherited thrombocytopenia.

^eSevere thrombocytopenia evolving to bone marrow failure.

mature MKs, explaining a proliferative response to TPO in MK progenitors and a defect in TPO clearance in platelets. Moreover, the retroviral *MPL* P106L mouse model performed in *mpl*^{-/-} mice induced a thrombocytosis phenotype with a high TPO level (50). Overall, *MPL* P106L seems to be compatible with an LOF mutation (traffic defect), which induces a paradoxical thrombocytosis through proliferation of MK progenitors and a defect of TPO clearance by the platelet mass.

JAK2 Mutations

The recurrent *JAK2* V617F mutation occurring at exon 14 of *JAK2* was identified in MPNs (34–37) and refractory sideroblastic anemia with thrombocytosis (RARS-T) (63). In MPNs, *JAK2* V617F is present in 50–60% of ET and PMF and 95% of polycythemia vera (PV). The replacement of a guanine to thymidine results in the substitution of a valine by a phenylalanine at position 617, in the pseudokinase JH2 domain of *JAK2*. The *JAK2* V617F mutation leads to stiffening of the helix alpha C of this JH2 domain, favoring the transphosphorylation of JH1 and thus the constitutive activation of *JAK2* (64). The *JAK2* V617F mutation requires the presence of homodimeric type 1 receptors such as *MPL*, *EPOR* and *G-CSFR* to induce a constitutive signaling and a spontaneous proliferation (65). The mutation can be heterozygous or homozygous after a mitotic recombination, with heterozygous clones mainly found

in ET while homozygous clones predominate in secondary MF showing a gene dosage effect contribution to the phenotype of the disease (66). In mice, all the models including retroviral, transgenic, and knock-in recapitulate an MPN-like disease (33, 67–70). Even if the most frequent phenotype is a PV progressing to MF, some differences have been observed depending on the species (human or mouse) and on the expression levels of *JAK2* V617F. Particularly, low levels of human *JAK2* V617F in hematopoiesis in inducible transgenic mice with a *jak2* minimal promoter led to an ET, whereas higher expression resulted in PV (71). Moreover, inducible transgenic expression of human *JAK2* V617F only in MK lineage (PF4-Cre) presents a specific ET-like phenotype (72). In knock-in mouse models, germline human *JAK2* V617F led to an ET when heterozygous and to a PV when homozygous (69). The conditional heterozygous mouse *jak2* V617F in hematopoiesis showed an ET/PV phenotype and a severe PV progressing to MF at homozygous state (67, 73). Therefore, as in human setting, the level of *JAK2* V617F determines the disease phenotype.

Other *JAK2* mutations have been highlighted in hereditary thrombocytosis with sometimes the same residue affected than in sporadic MPN cases but with a different amino acid changes, such as *JAK2* V617I, or on different residue located in both the pseudokinase (*JAK2* H608N, *JAK2* R564Q, *JAK2* S755R) and the

kinase domain of the protein (*JAK2* R938Q and *JAK2* R867Q) (38–41). All these mutants show a low constitutive kinase activity, seem to trigger spontaneous signaling only in the presence of MPL, and activate more STAT1 than the other STATs in contrast to *JAK2* V617F (41).

THPO Mutations

Germline GOF mutations in the *THPO* gene have been described in hereditary thrombocytosis. They are located in the 5'-untranslated region or affect splice donor sites of the gene and lead to an increased mRNA translation and synthesis of TPO (54, 55, 74). As an illustration, **Figure 2B** presents one family with *THPO* mutation predicted to affect the splice donor site of exon 2 (c.13+5G>C) in a hereditary thrombocytosis (**Figures 2B,C**).

Mutations on Important Regulators of the MPL/JAK2 Axis

Other molecules are important for the MPL/JAK2 signaling axis and the regulation of megakaryopoiesis.

CALR Mutations

CALR is a chaperone protein resident of the endoplasmic reticulum. It not only helps neosynthesized proteins and glycoproteins to fold before being addressed to the cell surface but also plays an essential role in calcium homeostasis (75). *CALR* mutations have been identified in ET and PMF in around 25–30% of the cases. These mutations are also, but rarely, found in RARS-T (76, 77). More than 50 different mutations have been described. All of them correspond to frameshift mutations in the exon 9 of the gene and lead to a new and quite similar positively charged C-terminal sequence and the loss of the retrieval KDEL motif into endoplasmic reticulum. The most frequent mutations accounting for more than 80–90% of cases are a 52 bp deletion (type 1 mutation or *CALRdel52*) and an insertion of 5 bp (type 2 mutation or *CALRins5*). These mutations do not have the same prevalence between ET and PMF with the *CALRdel52* more frequently associated with PMF than with ET and conversely for *CALRins5* (78–80). Recently, our laboratory and other groups showed that CALR mutants induce the JAK2/STAT pathway by specifically activating MPL and at a lower extent G-CSFR for the *CALRdel52* mutation only (81). The mechanism is incompletely understood. However, we and others have shown that CALR mutants interact with the glycosylated asparagine in the extracellular part of MPL *via* its lectin domain present in its N-globular domain, but MPL activation requires the new C-terminus and its positive charges (81–84). The retroviral mouse models recapitulate a thrombocytosis progressing into MF more frequently for *CALRdel52* mice than for *CALRins5* mice (84) and the transgenic *CALRdel52* mice recapitulate an ET (85).

LNK Mutations

Loss-of-function mutations of negative regulators of the MPL/JAK2 signaling axis have also been found to control megakaryopoiesis. SH2B3 (also named LNK) is an adaptor protein, inhibiting the JAK/STAT pathway. It binds to the phosphorylated tyrosine 813 of *JAK2* *via* its SH2 domain and controls

MPL-mediated signaling (24). *SH2B3* mutations were described in rare cases of ET and PMF patients (86). Most of them occur in a hot spot encompassing residues E208 to G234 of the Pleckstrin (PH) domain, but other mutations are located outside this domain (87, 88). Since this PH domain could be involved in the membrane localization of the protein through the binding to phosphatidylinositol-3-phosphate, the hypothesis is that the mutations detected lead to an abnormal localization of the protein in the cytoplasm (89). However, since the N-terminal dimerization domain remains intact in the LNK mutants, they could bind and interact with the normal (wild-type) protein in the cytoplasm, thus leading to a dominant-negative effect (86). However, the mechanism is still debated since the study of different LNK mutants in the PH domain in cell lines showed a moderate LOF with no dominant-negative effect and an unaffected binding to *JAK2* (90). *lnk*^{-/-} mice recapitulate a thrombocytosis associated with a splenomegaly and a MF (91). In MPNs, it is presently unclear if mutations in *LNK* are sufficient to trigger the disease or if another driver mutation such as *JAK2* V617F is absolutely required. Germline mutations in *LNK* have been associated with some primary erythrocytosis (92).

CBL Mutations

CBL is an E3 ligase, which induces the ubiquitination of MPL and *JAK2* and leads to their degradation by the proteasome and the lysosome pathways (22). Mutations in *c-CBL* are nucleotide substitutions or small insertions/deletions in the exons 8 and 9 of the gene and lead to modification of the linker or the RING finger domain (93). They are found in rare cases of ET and PMF. These mutations frequently result in the loss of ubiquitin E3 ligase activity, thus inhibiting lysosome or ubiquitin/proteasome-mediated degradation of MPL/JAK2.

Thus, all the molecules of the TPO/MPL/JAK2 signaling axis are likely to be involved in the MK hyperplasia associated with hereditary thrombocytosis and sporadic classical MPNs. They include GOF mutations of *THPO*, *MPL*, *JAK2*, and LOF mutations of *LNK* and *CBL*. These mutations lead to constitutive activation of the downstream signaling pathways, including STAT1/3/5, PI3K/AKT, and MAPK, that control the proliferation/survival and differentiation. Surprisingly, *MPL* LOF can be found in hereditary thrombocytosis by inducing a paradoxical effect on MK progenitors and platelets. Finally, unexpected mutations in *CALR* gene, a chaperone of the endoplasmic reticulum that activates MPL, have also been implicated in sporadic ETs.

MUTATIONS INVOLVED IN DEFECTIVE MEGAKARYOPOIESIS

TPO/MPL axis alterations can also lead to defects in megakaryopoiesis like in some autosomal recessive aplastic anemia and in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) (**Table 1**).

CAMT is a rare autosomal recessive bone marrow failure presenting an isolated thrombocytopenia at birth (94). These cases are associated with very high TPO levels. *MPL* mutations in CAMT are found at homozygous state or compound heterozygous mutations generally located throughout the *MPL*

gene, but with a higher recurrence in the exons 2 and 3 encoding the first cytokine receptor motif (52). They can be missense, splicing, frameshift, and nonsense mutations (52, 95). They are LOF mutations, and the frameshift or nonsense mutations are generally more aggressive than missense or splicing mutations leading to early progression to bone marrow failure (52). This is probably due to a complete absence of protein due to truncated proteins or proteins without intracellular signaling. Missense mutations are classified into three groups (**Figure 1**): (i) those that cannot be addressed to the cell surface and that are blocked in the endoplasmic reticulum, such as *MPL* R102P, *MPL* R257C/L, and *MPL* W154R seem to behave in the same way (51, 95, 96); (ii) those without TPO binding activity due to a loss of stabilization of hydrogen bond, but the *MPL* mutants, are still normally addressed to the cell surface in a glycosylated mature form, such as *MPL* F104S (19, 52, 96); (iii) those that lead to an unstable protein that is highly degraded, such as *MPL* P635L (51, 97). In *MPL* F104S-like mutation, addition of eltrombopag, a non-peptide TPO mimetic that binds to the transmembrane domain of *MPL* at histine 499, may overcome the thrombocytopenia (98, 99). In contrast, romiplostim that is a TPO peptide mimetic that binds to *MPL* in a competitive manner could not be used in this case. In *MPL* P635L-like mutations, some proteasome inhibitors may show benefit by stabilizing the protein. However, in *MPL* R102P-like mutations, the only curative treatment remains the bone marrow transplantation.

THPO LOF mutations (**Figure 2A**) have also been found in families with autosomal recessive bone marrow failure. In one study, a homozygous missense *THPO* R38C mutation was found in two affected siblings localized in the receptor-binding domain that destabilized the interaction between TPO and *MPL* (11). A recent work has identified three other families carrying two novel mutations *THPO* R99W, *THPO* R157* (57). One case was efficiently treated with TPO mimetics such as romiplostim as a substitution therapy. Alternatively, eltrombopag could also be used (98, 100). Finally, another heterozygous *THPO* R31* was observed but this time in two families of inherited thrombocytopenia. These cases presented with various penetrance of the disease, low TPO levels, and mild thrombocytopenia ($100 \times 10^9/L$) (56).

SRC GOF mutation (*SRC* E527K) has been identified in families with thrombocytopenia progressing into MF and displaying elevated TPO levels. *Src* family kinases such as BTK and SYK have been shown to interact with *MPL* at the residue Y591 and participate in its negative regulation since depletion of *SRC* induces an increase in *MPL* phosphorylation (101). *SRC* E527K mutation increases the kinase activity of *SRC* and may negatively

regulate *MPL* activation, which could partially explain the defective platelet production.

CONCLUSION

Overall, thrombocytosis and thrombocytopenia have been shown to be due to mutations in molecules of the TPO/*MPL*/*JAK2* signaling axis. In both disease cases, the same molecule can be affected leading to two opposite phenotypes by different mechanisms. Thrombocytosis is either due to GOF alterations that activate *MPL* signaling (*MPL*, *JAK2*, *CALR*) or due to LOF mutations of negative regulators of this pathway (*CBL*, *LNK*) (**Figure 1**). In certain cases, GOF mutations in *THPO* lead to increased TPO synthesis and thrombocytosis (**Figure 2**). Alternatively, thrombocytosis can paradoxically result from mutations in *MPL* that lead to defect in *MPL* trafficking and result in increased TPO levels by alteration of its clearance. Interestingly, these LOF mutations can thus functionally behave as GOF for platelet production *in vivo*.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The authors IP, CBC, MM, SM, CM and WV wrote different parts of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JVSV1-GERMPN-01), the Laurette Fugain foundation, the GIS-Institute for rare diseases for high-throughput sequencing (AO9102LS), the Association de recherche sur la moelle osseuse (ARMO), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (Fondation ARC libre 2012), and the regional PHRC AOR07014. IP, CM, WV are funded by the program "Investissements d'avenir" (Labex GR-Ex). MM is a recipient from la Ligue Nationale Contre le Cancer. SM is a recipient from MENRT grant.

FUNDING

Agence nationale pour la recherche (ANR-13-JVSV1-GERMPN-01) Association de recherche sur la moelle osseuse (ARMO) Association pour la Recherche contre le Cancer Regional PHRC AOR07014. IP, CM, WV are funded by the program "Investissements d'avenir" (Labex GR-Ex). MM is a recipient from la Ligue Nationale Contre le Cancer. SM is a recipient from MENRT grant.

REFERENCES

- Chang Y, Bluteau D, Debili N, Vainchenker W. From hematopoietic stem cells to platelets. *J Thromb Haemost* (2007) 5(Suppl 1):318–27. doi:10.1111/j.1538-7836.2007.02472.x
- Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* (2016) 351:aab2116. doi:10.1126/science.aab2116
- Hitchcock IS, Kaushansky K. Thrombopoietin from beginning to end. *Br J Haematol* (2014) 165:259–68. doi:10.1111/bjh.12772
- Lordier L, Jalil A, Aurade F, Larbret F, Larghero J, Debili N, et al. Megakaryocyte endomitosis is a failure of late cytokinesis related to defects in the contractile ring and Rho/Rock signaling. *Blood* (2008) 112:3164–74. doi:10.1182/blood-2008-03-144956
- Scurfield G, Radley JM. Aspects of platelet formation and release. *Am J Hematol* (1981) 10:285–96. doi:10.1002/ajh.2830100308
- Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, et al. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature* (2017) 544:105–9. doi:10.1038/nature21706

7. Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C, Abdelouahab H, Lacout C, Pasquier F, et al. JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood* (2014) 124:2104–15. doi:10.1182/blood-2014-03-559815
8. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* (2006) 107:1864–71. doi:10.1182/blood-2005-06-2600
9. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem* (1999) 274:13480–4. doi:10.1074/jbc.274.19.13480
10. Tortolani PJ, Johnston JA, Bacon CM, McVicar DW, Shimosaka A, Linnekin D, et al. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation and activation of the Janus kinase, JAK2. *Blood* (1995) 85:3444–51.
11. Dasouki MJ, Rafi SK, Olm-Shipman AJ, Wilson NR, Abhyankar S, Ganter B, et al. Exome sequencing reveals a thrombopoietin ligand mutation in a Micronesian family with autosomal recessive aplastic anemia. *Blood* (2013) 122:3440–9. doi:10.1182/blood-2012-12-473538
12. Qian S, Fu F, Li W, Chen Q, de Sauvage FJ. Primary role of the liver in thrombopoietin production shown by tissue-specific knockout. *Blood* (1998) 92:2189–91.
13. Fielder PJ, Gurney AL, Stefanich E, Marian M, Moore MW, Carver-Moore K, et al. Regulation of thrombopoietin levels by c-mpl-mediated binding to platelets. *Blood* (1996) 87:2154–61.
14. Fielder PJ, Hass P, Nagel M, Stefanich E, Widmer R, Bennett GL, et al. Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin. *Blood* (1997) 89:2782–8.
15. Wolber EM, Jelkmann W. Interleukin-6 increases thrombopoietin production in human hepatoma cells HepG2 and Hep3B. *J Interferon Cytokine Res* (2000) 20:499–506. doi:10.1089/10799900050023915
16. Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, Visner G, Hartwig JH, Falet H, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med* (2015) 21:47–54. doi:10.1038/nm.3770
17. Royer Y, Staerk J, Costuleanu M, Courtoy PJ, Constantinescu SN. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J Biol Chem* (2005) 280:27251–61. doi:10.1074/jbc.M501376200
18. Chen WM, Yu B, Zhang Q, Xu P. Identification of the residues in the extracellular domain of thrombopoietin receptor involved in the binding of thrombopoietin and a nuclear distribution protein (human NUDC). *J Biol Chem* (2010) 285:26697–709. doi:10.1074/jbc.M110.120956
19. Fox NE, Lim J, Chen R, Geddis AE. F104S c-Mpl responds to a transmembrane domain-binding thrombopoietin receptor agonist: proof of concept that selected receptor mutations in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia can be stimulated with alternative thrombopoietic agents. *Exp Hematol* (2010) 38:384–91. doi:10.1016/j.exphem.2010.02.007
20. Staerk J, Defour JP, Pecquet C, Leroy E, Antoine-Poirel H, Brett I, et al. Orientation-specific signalling by thrombopoietin receptor dimers. *EMBO J* (2011) 30:4398–413. doi:10.1038/emboj.2011.315
21. Drachman JG, Rojnuckarin P, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction: studies from cell lines and primary cells. *Methods* (1999) 17:238–49. doi:10.1006/meth.1998.0734
22. Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K, Hitchcock IS. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* (2010) 115:1254–63. doi:10.1182/blood-2009-06-227033
23. Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* (1999) 21:47–52. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199901)21:1<47::AID-BIES6>3.0.CO;2-N
24. Tong W, Lodish HF. Lnk inhibits TPO-MPL signaling and TPO-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* (2004) 200:569–80. doi:10.1084/jem.20040762
25. Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, et al. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95:10626–31. doi:10.1073/pnas.95.18.10626
26. Alexander WS, Roberts AW, Nicola NA, Li R, Metcalf D. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* (1996) 87:2162–70.
27. de Sauvage FJ, Carver-Moore K, Luoh SM, Ryan A, Dowd M, Eaton DL, et al. Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J Exp Med* (1996) 183:651–6. doi:10.1084/jem.183.2.651
28. Grisouard J, Hao-Shen H, Dirnhofer S, Wagner KU, Skoda RC. Selective deletion of Jak2 in adult mouse hematopoietic cells leads to lethal anemia and thrombocytopenia. *Haematologica* (2014) 99:e52–4. doi:10.3324/haematol.2013.100016
29. Shimoda K, Kato K, Aoki K, Matsuda T, Miyamoto A, Shibamori M, et al. Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. *Immunity* (2000) 13:561–71. doi:10.1016/S1074-7613(00)00055-8
30. Meyer SC, Keller MD, Woods BA, LaFave LM, Bastian L, Kleppe M, et al. Genetic studies reveal an unexpected negative regulatory role for Jak2 in thrombopoiesis. *Blood* (2014) 124:2280–4. doi:10.1182/blood-2014-03-560441
31. Ng AP, Kauppi M, Metcalf D, Hyland CD, Josefsson EC, Lebois M, et al. Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:5884–9. doi:10.1073/pnas.1404354111
32. Lannutti BJ, Epp A, Roy J, Chen J, Josephson NC. Incomplete restoration of Mpl expression in the mpl^{-/-} mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. *Blood* (2009) 113:1778–85. doi:10.1182/blood-2007-11-124859
33. Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, et al. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood* (2009) 113:1768–77. doi:10.1182/blood-2008-03-146084
34. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* (2005) 365:1054–61. doi:10.1016/S0140-6736(05)74230-6
35. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* (2005) 434:1144–8. doi:10.1038/nature03546
36. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* (2005) 352:1779–90. doi:10.1056/NEJMoa051113
37. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* (2005) 7:387–97. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023
38. Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE, Schuh A. Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med* (2012) 366:967–9. doi:10.1056/NEJMc1200349
39. Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I, Pietra D, Nivarthi H, Moriggi R, et al. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* (2014) 89:117–8. doi:10.1002/ajh.23614
40. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, Corbo LM, Roh ME, Seeliger MA, et al. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood* (2014) 123:1059–68. doi:10.1182/blood-2012-12-473777
41. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* (2014) 123:1372–83. doi:10.1182/blood-2013-05-504555
42. Abe M, Suzuki K, Inagaki O, Sassa S, Shikama H. A novel MPL point mutation resulting in thrombopoietin-independent activation. *Leukemia* (2002) 16:1500–6. doi:10.1038/sj.leu.2402554
43. Chaligne R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* (2008) 22:1557–66. doi:10.1038/leu.2008.137
44. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* (2004) 103:4198–200. doi:10.1182/blood-2003-10-3471
45. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPLW515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* (2006) 108:3472–6. doi:10.1182/blood-2006-04-018879
46. 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* (2006) 3:e270. doi:10.1371/journal.pmed.0030270

47. Beer PA, Campbell PJ, Scott LM, Bench AJ, Erber WN, Bareford D, et al. MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort. *Blood* (2008) 112:141–9. doi:10.1182/blood-2008-01-131664
48. Moliterno AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) 101:11444–7. doi:10.1073/pnas.0404241101
49. El-Hariri el HA, Roesl C, Ballmaier M, Germeshausen M, Frye-Boukhriss H, von Neuhoff N, et al. Familial thrombocytosis caused by the novel germ-line mutation p.Pro106Leu in the MPL gene. *Br J Haematol* (2009) 144:185–94. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07430.x
50. Favale F, Messaoudi K, Varghese LN, Boukour S, Pecquet C, Gryshkova V, et al. An incomplete trafficking defect to the cell-surface leads to paradoxical thrombocytosis for human and murine MPL P106L. *Blood* (2016) 128:3146–58. doi:10.1182/blood-2016-06-722058
51. van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, Peters M, Faulkner LB, de Haas M, et al. Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2000) 110:441–8. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02175.x
52. Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K. MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Hum Mutat* (2006) 27:296. doi:10.1002/humu.9415
53. Ghilardi N, Wiestner A, Kikuchi M, Ohsaka A, Skoda RC. Hereditary thrombocythaemia in a Japanese family is caused by a novel point mutation in the thrombopoietin gene. *Br J Haematol* (1999) 107:310–6. doi:10.1046/j.1365-2141.1999.01710.x
54. Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, Skoda RC. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat Genet* (1998) 18:49–52. doi:10.1038/ng0198-49
55. Kondo T, Okabe M, Sanada M, Kurosawa M, Suzuki S, Kobayashi M, et al. Familial essential thrombocythemia associated with one-base deletion in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene. *Blood* (1998) 92:1091–6.
56. Noris P, Marconi C, De Rocco D, Melazzini F, Pippucci T, Loffredo G, et al. A new form of inherited thrombocytopenia due to monoallelic loss of function mutation in the thrombopoietin gene. *Br J Haematol* (2017). doi:10.1111/bjh.14694
57. Seo A, Ben-Harosh M, Sirin M, Stein J, Dgany O, Kaplulshnik J, et al. Bone marrow failure unresponsive to bone marrow transplant is caused by mutations in THPO. *Blood* (2017) 130(7):875–80. doi:10.1182/blood-2017-02-768036
58. Defour JP, Chachoua I, Pecquet C, Constantinescu SN. Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* (2016) 30(5):1214–6. doi:10.1038/leu.2015.271
59. Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* (2016) 127:333–42. doi:10.1182/blood-2015-07-661983
60. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2016) 127:325–32. doi:10.1182/blood-2015-07-661835
61. Liu K, Martini M, Rocca B, Amos CI, Teofili L, Giona F, et al. Evidence for a founder effect of the MPL-S505N mutation in eight Italian pedigrees with hereditary thrombocythemia. *Haematologica* (2009) 94:1368–74. doi:10.3324/haematol.2009.005918
62. Stockklauser C, Klotter AC, Dickemann N, Kuhlee IN, Duffert CM, Kerber C, et al. The thrombopoietin receptor P106L mutation functionally separates receptor signaling activity from thrombopoietin homeostasis. *Blood* (2015) 125:1159–69. doi:10.1182/blood-2014-07-587170
63. Szpurka H, Tiu R, Murugesan G, Aboudola S, Hsi ED, Theil KS, et al. Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood* (2006) 108:2173–81. doi:10.1182/blood-2006-02-005751
64. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol* (2012) 19:754–9. doi:10.1038/nsmb.2348
65. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102:18962–7. doi:10.1073/pnas.0509714102
66. 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) 108:2435–7. doi:10.1182/blood-2006-04-018259
67. Hasan S, Lacout C, Marty C, Cuingnet M, Solary E, Vainchenker W, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood* (2013) 122:1464–77. doi:10.1182/blood-2013-04-498956
68. Lacout C, Pisani DE, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* (2006) 108:1652–60. doi:10.1182/blood-2006-02-002030
69. Li J, Kent DG, Godfrey AL, Manning H, Nangalia J, Aziz A, et al. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. *Blood* (2014) 123:3139–51. doi:10.1182/blood-2013-06-510222
70. Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, Heidel FH, Purdon A, Vu T, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- α in a murine model of polycythemia vera. *Blood* (2013) 121:3692–702. doi:10.1182/blood-2012-05-432989
71. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* (2008) 111:3931–40. doi:10.1182/blood-2007-08-107748
72. Zhan H, Ma Y, Lin CH, Kaushansky K. JAK2V617F-mutant megakaryocytes contribute to hematopoietic stem/progenitor cell expansion in a model of murine myeloproliferation. *Leukemia* (2016) 30:2332–41. doi:10.1038/leu.2016.114
73. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* (2010) 115:3589–97. doi:10.1182/blood-2009-04-215848
74. Ghilardi N, Skoda RC. A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA. *Blood* (1999) 94:1480–2.
75. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J* (2009) 417:651–66. doi:10.1042/BJ20081847
76. Klampff T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* (2013) 369:2379–90. doi:10.1056/NEJMoa1311347
77. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundle G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* (2013) 369:2391–405. doi:10.1056/NEJMoa1312542
78. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* (2015) 29:249–52. doi:10.1038/leu.2014.270
79. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia* (2014) 28:1568–70. doi:10.1038/leu.2014.83
80. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol* (2014) 89:E121–4. doi:10.1002/ajh.23743
81. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* (2016) 127:1325–35. doi:10.1182/blood-2015-11-681932
82. 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* (2016) 127:1307–16. doi:10.1182/blood-2015-09-671172

83. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, Perales-Paton J, Rosen EA, Ko A, et al. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov* (2016) 6:368–81. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1434
84. 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* (2016) 127:1317–24. doi:10.1182/blood-2015-11-679571
85. Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiunten A, et al. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia* (2017) 31:1136–44. doi:10.1038/leu.2016.308
86. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD Jr, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2010) 116:988–92. doi:10.1182/blood-2010-02-270108
87. Ha JS, Jeon DS. Possible new LNK mutations in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* (2011) 86:866–8. doi:10.1002/ajh.22107
88. Hurtado C, Erquiaga I, Aranaz P, Migueliz I, Garcia-Delgado M, Novo FJ, et al. LNK can also be mutated outside PH and SH2 domains in myeloproliferative neoplasms with and without V617F/JAK2 mutation. *Leuk Res* (2011) 35:1537–9. doi:10.1016/j.leukres.2011.07.009
89. Gery S, Koeffler HP. Role of the adaptor protein LNK in normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene* (2013) 32:3111–8. doi:10.1038/onc.2012.435
90. Koren-Michowitz M, Gery S, Tabayashi T, Lin D, Alvarez R, Nagler A, et al. SH2B3 (LNK) mutations from myeloproliferative neoplasms patients have mild loss of function against wild type JAK2 and JAK2 V617F. *Br J Haematol* (2013) 161:811–20. doi:10.1111/bjh.12327
91. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, Furlonger C, Vesely S, Bernstein A, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* (2002) 195:1599–611. doi:10.1084/jem.20011883
92. Spolverini A, Pieri L, Guglielmelli P, Pancrazzi A, Fanelli T, Paoli C, et al. Infrequent occurrence of mutations in the PH domain of LNK in patients with JAK2 mutation-negative 'idiopathic' erythrocytosis. *Haematologica* (2013) 98:e101–2. doi:10.3324/haematol.2013.090175
93. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, Zoi K, Zoi C, McGuire C, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* (2009) 113:6182–92. doi:10.1182/blood-2008-12-194548
94. Geddis AE. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Pediatr Blood Cancer* (2011) 57:199–203. doi:10.1002/pbc.22927
95. Fox NE, Chen R, Hitchcock I, Keates-Baleeiro J, Frangoul H, Geddis AE. Compound heterozygous c-Mpl mutations in a child with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: functional characterization and a review of the literature. *Exp Hematol* (2009) 37:495–503. doi:10.1016/j.exphem.2009.01.001
96. Varghese LN, Zhang JG, Young SN, Willson TA, Alexander WS, Nicola NA, et al. Functional characterization of c-Mpl ectodomain mutations that underlie congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Growth Factors* (2014) 32:18–26. doi:10.3109/08977194.2013.874347
97. Tijssen MR, di Summa F, van den Oudenrijn S, Zwaginga JJ, van der Schoot CE, Voermans C, et al. Functional analysis of single amino-acid mutations in the thrombopoietin-receptor Mpl underlying congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2008) 141:808–13. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07139.x
98. Bussel JB. Update on eltrombopag for ITP. *Oncology (Williston Park)* (2009) 23:1177–8.
99. Leroy E, Defour JP, Sato T, Dass S, Gryshkova V, Shwe MM, et al. His499 regulates dimerization and prevents oncogenic activation by asparagine mutations of the human thrombopoietin receptor. *J Biol Chem* (2016) 291:2974–87. doi:10.1074/jbc.M115.696534
100. Cines DB, Yasothan U, Kirkpatrick P. Romiplostim. *Nat Rev Drug Discov* (2008) 7:887–8. doi:10.1038/nrd2741
101. Sangkhae V, Saur SJ, Kaushansky A, Kaushansky K, Hitchcock IS. Phosphorylated c-Mpl tyrosine 591 regulates thrombopoietin-induced signaling. *Exp Hematol* (2014) 42(477–486):e474. doi:10.1016/j.exphem.2014.02.007
102. Turro E, Greene D, Wijngaerts A, Thys C, Lentaingne C, Bariana TK, et al. A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies. *Sci Transl Med* (2016) 8:328ra330. doi:10.1126/scitranslmed.aad7666

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Plo, Bellanné-Chantelot, Mosca, Mazzi, Marty and Vainchenker. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Identification of *MPL* R102P Mutation in Hereditary Thrombocytosis

Christine Bellanné-Chantelot^{1,2}, Matthieu Mosca^{1,3,4}, Caroline Marty^{1,3,4}, Rémi Favier^{1,5}, William Vainchenker^{1,3,4} and Isabelle Plo^{1,3,4*}

¹INSERM UMR1170, Gustave Roussy, Villejuif, France, ²Department of Genetics, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP) Hôpitaux Universitaires Pitié Salpêtrière—Charles Foix, UPMC Univ Paris 06, Paris, France, ³Université Paris-Saclay, UMR1170, Gustave Roussy, Villejuif, France, ⁴Gustave Roussy, UMR1170, Villejuif, France, ⁵Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Service d'Hématologie biologique, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires (CRPP), Hôpital Armand Trousseau, Paris, France

The molecular basis of hereditary thrombocytosis is germline mutations affecting the thrombopoietin (TPO)/TPO receptor (*MPL*)/*JAK2* signaling axis. Here, we report one family presenting two cases with a mild thrombocytosis. By sequencing *JAK2* and *MPL* coding exons, we identified a germline *MPL* R102P heterozygous mutation in the proband and his daughter. Concomitantly, we detected high TPO levels in the serum of these two patients. The mutation was not found in three other unaffected cases from the family except in another proband's daughter who did not present thrombocytosis but had a high TPO level. The *MPL* R102P mutation was first described in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia in a homozygous state with a loss-of-function activity. It was previously shown that *MPL* R102P was blocked in the endoplasmic reticulum without being able to translocate to the plasma membrane. Thus, this case report identifies for the first time that *MPL* R102P mutation can differently impact megakaryopoiesis: thrombocytosis or thrombocytopenia depending on the presence of the heterozygous or homozygous state, respectively. The paradoxical effect associated with heterozygous *MPL* R102P may be due to subnormal cell-surface expression of wild-type *MPL* in platelets inducing a defective TPO clearance. As a consequence, increased TPO levels may activate megakaryocyte progenitors that express a lower, but still sufficient level of *MPL* for the induction of proliferation.

OPEN ACCESS

Edited by:

Pierre De Meyts,
de Duve Institute, Belgium

Reviewed by:

Jean-Baptiste Demoulin,
Catholic University of Louvain,
Belgium

James M. Murphy,
Walter and Eliza Hall Institute of
Medical Research, Australia

*Correspondence:

Isabelle Plo
isabelle.plo@gustaveroussy.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Structural
Endocrinology,
a section of the journal
Frontiers in Endocrinology

Received: 09 August 2017

Accepted: 28 August 2017

Published: 20 September 2017

Citation:

Bellanné-Chantelot C, Mosca M,
Marty C, Favier R, Vainchenker W
and Plo I (2017) Identification
of *MPL* R102P Mutation in
Hereditary Thrombocytosis.
Front. Endocrinol. 8:235.
doi: 10.3389/fendo.2017.00235

Keywords: thrombopoietin, *JAK2*, *MPL* R102P, thrombocytosis, thrombocytopenia, CAMT

BACKGROUND

Hereditary thrombocytosis is characterized by an increase in platelets above $450 \times 10^9/L$ due to germline genetic abnormalities. These mutations affect the thrombopoietin (TPO)/TPO receptor (*MPL*)/*JAK2* axis that is essential for megakaryopoiesis. First, heterozygous mutations in the *THPO* gene located in the 5'-untranslated region or in splice donor sites lead to an increased mRNA translation and synthesis of TPO (1–3). Second, several heterozygous *JAK2* mutations were discovered that are located not only in the pseudokinase but also in the kinase domains such as *JAK2* H608N, *JAK2* R564Q, *JAK2* S755R, *JAK2* R938Q, and *JAK2* R867Q (4–7). These mutants harbor low constitutive kinase activity that is dependent on the presence of *MPL* (5). Third, *MPL* mutations were identified affecting different residues of the receptor and involving different mechanisms. The heterozygous gain-of-function mutation *MPL* S505N was identified in the transmembrane domain of *MPL* and was found to induce its dimerization and activation (8). Interestingly, loss-of-function

mutations have also been identified including the homozygous *MPL* P106L in Saoudian and Koweitian families (9, 10). Studies have shown that *MPL* P106L presents a defective trafficking to the cell membrane leading to a decrease in TPO clearance by platelets, which results in high circulating TPO levels that induce a proliferative response to TPO in immature cells (9, 10). The *MPL* K39N polymorphism was also discovered in 7% of African Americans and homozygous cases present a thrombocytosis associated with an abnormal *MPL* maturation (11).

CASE PRESENTATION

We have identified two members of a family displaying mild thrombocytosis diagnosed at an early age (21 and 41 years old) with platelet counts around $600 \times 10^9/L$. Four other members of the family were included in the study and the pedigree was registered in the National collection of myeloproliferative neoplasms (MPNs) (DC 2009-957). All participants gave their written informed consent in accordance to the Declaration of Helsinki and the study approved by Ethical committee of Ile de France (no. IDRCB 2008-A00658-47). Clinical and biological annotations were recorded in an Access database approved by the French computer commission (CNIL #815419).

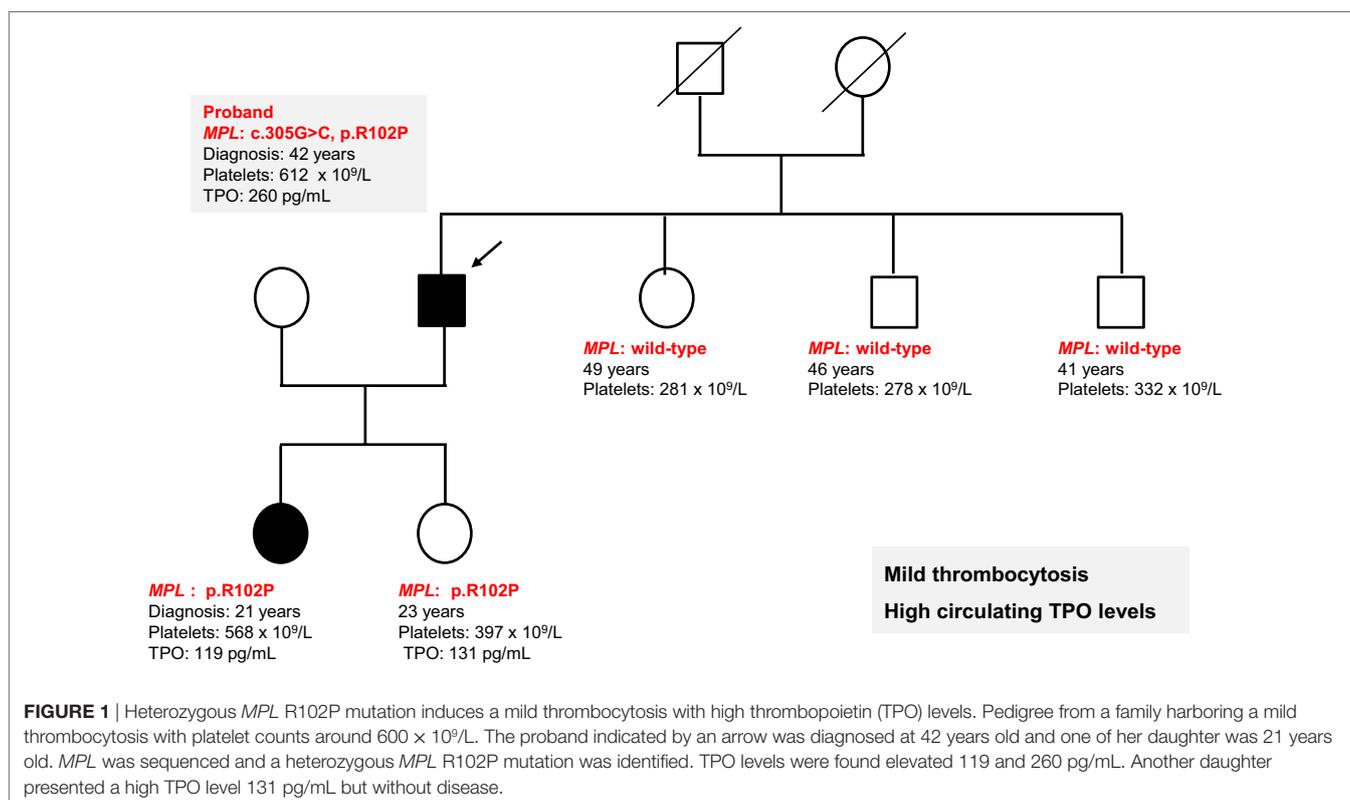
All exons of *MPL* and *JAK2* genes were sequenced in the proband's DNA extracted from total blood cells (indicated by an arrow in **Figure 1**) using the BigDye Terminator chemistry (Life Technologies) on an ABI3730 Genetic Analyser (Applied Biosystem). We found a heterozygous *MPL* R102P mutation that had been previously reported in congenital amegakaryocytic

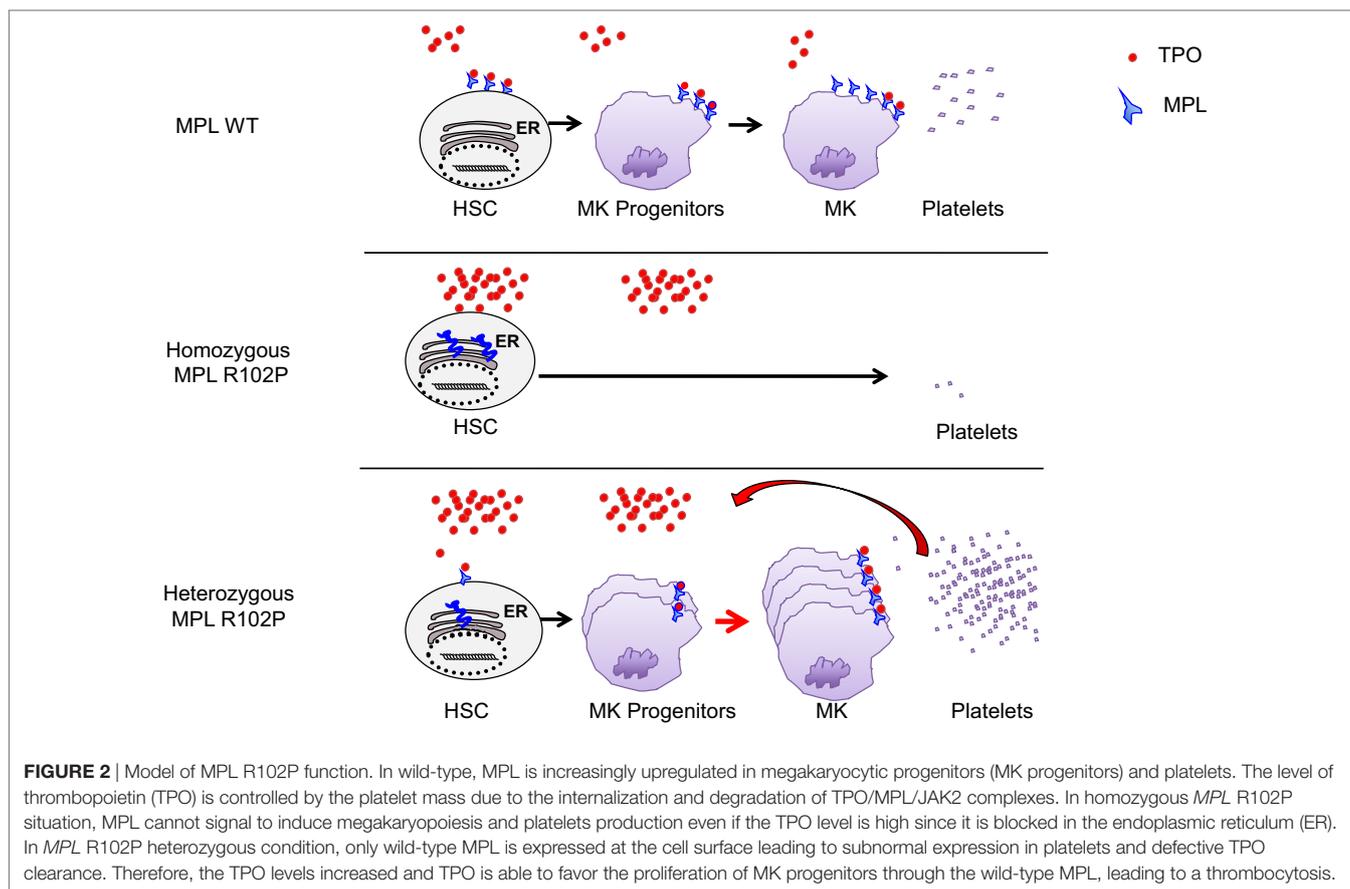
thrombocytopenia (CAMT) but was previously found to be in a homozygous or compound heterozygous state leading to a complete defect in *MPL* function (12–14). This *MPL* R102P mutation was also identified in the other affected case demonstrating that this event was germline. TPO levels were measured by ELISA in the two affected subjects and were found elevated (119 and 260 pg/mL) compared to the normal range (<30 pg/mL). The mutation was not found in the other non-affected members of the family except in the second 23-year-old proband's daughter. This case had a normal but rather high level of $397 \times 10^9/L$ platelets and a high TPO level of 131 pg/mL. However, this asymptomatic carrier has not reached the father's age at diagnosis and thus will be carefully followed in clinics. These results suggest an incomplete penetrance of the *MPL* mutation depending on age.

DISCUSSION

MPL is a homodimeric type 1 receptor that controls megakaryopoiesis after TPO binding. It is expressed at high levels in hematopoietic stem cells, megakaryocytic (MK) progenitors, megakaryocytes, and platelets, while the TPO levels are controlled in large part by the platelet mass due to internalization of TPO/*MPL*/*JAK2* complexes.

Many mutations affecting *MPL* induce deregulation of megakaryopoiesis. Although some are gain-of-function, such as *MPL* W515K/L and S505N, leading to MPNs or hereditary thrombocytosis (8, 15), others such as *MPL* R102P and F104S are loss-of-function leading to CAMT (12–14). The *MPL* R102P receptor function was previously investigated and studies have shown that





it is not addressed to the cell-surface and induces no proliferation of Ba/F3 cell lines (14). This loss of function was caused by the presence of an abnormal glycosylated receptor resulting from its blockade in the endoplasmic reticulum (ER) (12–14). In CAMT, *MPL* mutations are recessive events (homozygous or compound heterozygous state) generally located throughout the *MPL* gene, implying that no functional MPL receptors are present at the cell surface.

This case report identifies for the first time that *MPL* R102P mutation can differently impact megakaryopoiesis depending on heterozygous and homozygous states (Figure 2). Indeed, based on previous studies showing that *MPL* R102P remains in the ER, we propose that in the heterozygous state, only the wild-type *MPL* form is addressed to the cell surface leading to subnormal expression in platelets and a consequent deficit in TPO clearance. Therefore, heterozygous *MPL* R102P results in an increased TPO levels in the serum, which is able to induce the proliferation of MK progenitors expressing sufficient MPL. Altogether this phenomenon leads to thrombocytosis by a decreased TPO clearance, as has also been demonstrated in transgenic mice with a low expression of MPL in megakaryocytes and platelets (16, 17).

CONCLUDING REMARKS

We identified one family of hereditary thrombocytosis with three members harboring a germline *MPL* R102P heterozygous mutation with high TPO levels in the serum but with incomplete

penetrance of the phenotype. These results contrast with the presence of the same *MPL* R102P mutation at homozygous state in CAMT.

ETHICS STATEMENT

Four other members of the family were included in the study, and the pedigree was registered in the National collection of myeloproliferative neoplasms (MPNs) (DC 2009-957). All participants gave their written informed consent in accordance to the Declaration of Helsinki and the study approved by Ethical committee of Ile de France (No. IDRCB 2008-A00658-47). Clinical and biological annotations were recorded in an Access database approved by the French computer commission (CNIL #815419).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C-BC, IP, and WV designed the work and wrote the manuscript. MM and RF performed experiments. CM performed experiments and contributed to the writing of the manuscript.

FUNDING

This work was supported by grants from l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-JVSV1-GERMPN-01), the Laurette Fugain foundation, the GIS-Institute for rare diseases for high throughput

sequencing (AO9102LS), the Association de recherche sur la moelle osseuse (ARMO), the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (Fondation ARC libre 2012), and the regional

PHRC AOR07014. The program “Investissements d’avenir” is founding the Labex GR-Ex (IP, WV). MM is a recipient from La ligue Nationale contre le cancer.

REFERENCES

- Ghildardi N, Skoda RC. A single-base deletion in the thrombopoietin (TPO) gene causes familial essential thrombocythemia through a mechanism of more efficient translation of TPO mRNA. *Blood* (1999) 94:1480–2.
- Kondo T, Okabe M, Sanada M, Kurosawa M, Suzuki S, Kobayashi M, et al. Familial essential thrombocythemia associated with one-base deletion in the 5'-untranslated region of the thrombopoietin gene. *Blood* (1998) 92:1091–6.
- Wiestner A, Schlemper RJ, van der Maas AP, Skoda RC. An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythemia. *Nat Genet* (1998) 18:49–52. doi:10.1038/ng0198-49
- Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, Corbo LM, Roh ME, Seeliger MA, et al. A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. *Blood* (2014) 123:1059–68. doi:10.1182/blood-2012-12-473777
- Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, et al. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* (2014) 123:1372–83. doi:10.1182/blood-2013-05-504555
- Mead AJ, Rugless MJ, Jacobsen SE, Schuh A. Germline JAK2 mutation in a family with hereditary thrombocytosis. *N Engl J Med* (2012) 366:967–9. doi:10.1056/NEJMc1200349
- Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I, Pietra D, Nivarthi H, Moriggl R, et al. A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* (2014) 89:117–8. doi:10.1002/ajh.23614
- Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* (2004) 103:4198–200. doi:10.1182/blood-2003-10-3471
- El-Harith el HA, Roesl C, Ballmaier M, Germeshausen M, Frye-Boukhriess H, von Neuhoff N, et al. Familial thrombocytosis caused by the novel germ-line mutation p.Pro106Leu in the MPL gene. *Br J Haematol* (2009) 144:185–94. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07430.x
- Favale F, Messaoudi K, Varghese LN, Boukour S, Pecquet C, Gryshkova V, et al. An incomplete trafficking defect to the cell-surface leads to paradoxical thrombocytosis for human and murine MPL P106L. *Blood* (2016) 128:3146–58. doi:10.1182/blood-2016-06-722058
- Molitero AR, Williams DM, Gutierrez-Alamillo LI, Salvatori R, Ingersoll RG, Spivak JL. Mpl Baltimore: a thrombopoietin receptor polymorphism associated with thrombocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) 101:11444–7. doi:10.1073/pnas.0404241101
- Tijssen MR, di Summa F, van den Oudenrijn S, Zwaginga JJ, van der Schoot CE, Voermans C, et al. Functional analysis of single amino-acid mutations in the thrombopoietin-receptor Mpl underlying congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2008) 141:808–13. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07139.x
- van den Oudenrijn S, Bruin M, Folman CC, Peters M, Faulkner LB, de Haas M, et al. Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br J Haematol* (2000) 110:441–8. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02175.x
- Varghese LN, Zhang JG, Young SN, Willson TA, Alexander WS, Nicola NA, et al. Functional characterization of c-Mpl ectodomain mutations that underlie congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Growth Factors* (2014) 32:18–26. doi:10.3109/08977194.2013.874347
- 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* (2006) 3:e270. doi:10.1371/journal.pmed.0030270
- Lannutti BJ, Epp A, Roy J, Chen J, Josephson NC. Incomplete restoration of Mpl expression in the mpl^{-/-} mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. *Blood* (2009) 113:1778–85. doi:10.1182/blood-2007-11-124859
- Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, et al. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. *Blood* (2009) 113:1768–77. doi:10.1182/blood-2008-03-146084

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Bellanné-Chantelot, Mosca, Marty, Favier, Vainchenker and Plo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-03627-9

OPEN

HSP27 is a partner of JAK2-STAT5 and a potential therapeutic target in myelofibrosis

Margaux Sevin^{1,2}, Lucia Kubovcaková³, Nicolas Pernet^{1,2}, Sébastien Causse^{1,2}, Franck Vitte⁴, Jean Luc Villeval^{5,6}, Catherine Lacout^{5,6}, Marine Cordonnier^{1,2}, Fernando Rodrigues-Lima⁷, Gaétan Chanteloup^{1,2}, Matthieu Mosca^{5,6}, Marie-Lorraine Chrétien⁸, Jean Noël Bastie^{1,2,8}, Sylvain Audia⁸, Paul Sagot⁸, Selim Ramla⁸, Laurent Martin⁸, Martin Gleave⁹, Valérie Mezger^{10,11,12}, Radek Skoda³, Isabelle Plo^{5,6}, Carmen Garrido^{1,2,13,14}, François Girodon^{1,2,8} & Aurélie de Thonel^{1,2,10,11}

Heat shock protein 27 (HSP27/HSPB1) is a stress-inducible chaperone that facilitates cancer development by its proliferative and anti-apoptotic functions. The OGX-427 antisense oligonucleotide against HSP27 has been reported to be beneficial against idiopathic pulmonary fibrosis. Here we show that OGX-427 is effective in two murine models of thrombopoietin- and *JAKV617F*-induced myelofibrosis. OGX-427 limits disease progression and is associated with a reduction in spleen weight, in megakaryocyte expansion and, for the *JAKV617F* model, in fibrosis. HSP27 regulates the proliferation of *JAK2V617F*-positive cells and interacts directly with JAK2/STAT5. We also show that its expression is increased in both CD34⁺ circulating progenitors and in the serum of patients with JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms with fibrosis. Our data suggest that HSP27 plays a key role in the pathophysiology of myelofibrosis and represents a new potential therapeutic target for patients with myeloproliferative neoplasms.

¹ University of Bourgogne Franche-Comté, Dijon 21000, France. ² INSERM, UMR 1231, Laboratory of Excellence Ligue National contre le Cancer, Dijon 21000, France. ³ Department of Biomedicine, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Basel 20 4031, Switzerland. ⁴ Cypath, Dijon 21000, France. ⁵ University Paris XI, UMR 1170, Gustave Roussy, Villejuif 94800, France. ⁶ INSERM, UMR 1170, Laboratory of Excellence GR-Ex, Villejuif 94800, France. ⁷ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Unite BFA, CNRS UMR 8251, 75013 Paris, France. ⁸ Hospital University Center (CHU), Dijon 21000, France. ⁹ The Vancouver Prostate Centre, University of British Columbia, Vancouver BC V6H 3Z6 BC, Canada. ¹⁰ CNRS, UMR7216 Épigénétique et Destin Cellulaire, Paris 75013 Cedex 13, France. ¹¹ University of Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris 75013 Cedex 13, France. ¹² Département Hospitalo-Universitaire DHU PROTECT, Paris 75010, France. ¹³ Centre Georges François Leclerc (CGFL), Dijon 21000, France. ¹⁴ Scientific Cooperation Foundation (FCS) of Bourgogne Franche-Comté, LipSTIC LabEx, Dijon 21071, France. These authors jointly supervised this work: Carmen Garrido, François Girodon, Aurélie de Thonel. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.G. (email: francois.girodon@chu-dijon.fr) or to A.d.L. (email: aurelie.dethonel@univ-paris-diderot.fr)

Heat shock proteins (HSPs) are highly conserved molecular chaperones whose synthesis is induced by different stresses in both environmental and pathophysiological conditions¹. HSP70 (HSPA1A, NP_005336) and HSP27 (HSPB1, NP_001531 (human); Hsp27, Hspb1, NP_038588 (mouse)) are the most strongly induced proteins following aggression due to oxidative stress, anti-cancer agents or ionizing radiation for example². These HSPs were originally characterized as chaperones due to their ability to prevent aggregation and restore proteostasis and to their participation in the transport of proteins. These HSPs also have a strong cytoprotective action through the inhibition of apoptosis and autophagy processes^{3, 4}. Because cancer cells have to re-wire their metabolism, they need chaperones for their survival. As a consequence, HSPs are abnormally abundant in cancer cells and have become potent targets in cancer therapy⁵.

HSP27 belongs to the family of small heat shock proteins and is overexpressed in solid cancers, including prostate and breast cancers, as well as in haematological malignancies^{6–8}. It contributes to tumorigenesis and resistance to chemotherapy via its proliferative and anti-apoptotic functions^{9, 10}. HSP27 is secreted by cancer cells and has been found in the serum of cancer patients, where its presence is often associated with a poor prognosis^{11, 12}. In addition, our team recently demonstrated the beneficial effect of a new-generation antisense oligonucleotide against HSP27, OGX-427, which targets the human and rodent *Hsp27* translation initiation site^{13, 14}, in a murine model of idiopathic pulmonary fibrosis¹³. This compound is currently under clinical evaluation (phase II clinical trials) as a chemosensitizing agent in solid tumours¹⁵. Furthermore, we and others have shown that HSP27 was strongly expressed in samples from patients with idiopathic pulmonary and kidney tubulointerstitial fibrosis^{13, 16}.

Myelofibrosis (MF) is a chronic degenerative disorder associated with megakaryocytic abnormalities and progressive marrow fibrosis, in which fibrous tissues replace red bone marrow. These two distinctive features are used in patients to monitor the progression of the disease¹⁷. The clinical features of MF generally include constitutional symptoms, splenomegaly and progressive marrow failure, which result in reduced life expectancy. MF is mostly related to myeloproliferative neoplasms (MPN) but can also be induced following treatment with haematopoietic growth factors like thrombopoietin (TPO)^{17, 18}. One of the most frequent signalling pathways involved in MF pathogenesis is the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) pathway. The aberrant activation of the JAK/STAT pathway may result from somatic mutations directly affecting JAK activity, excessive cytokine stimulation by factors like TPO and/or epigenetic modifications leading to abnormal gene regulation^{19–21}.

Given the reported role of HSP27 in leukaemia and in fibrotic disorders, we hypothesized that HSP27 might be involved in MF. In this study, we show that specific inhibition of HSP27 using OGX-427 limits myelofibrosis progression in two murine models of MF^{15, 22, 23} and affects the JAK2/STAT signalling pathway. Our data also reveal an increase of HSP27 in samples from patients with MF suggesting that HSP27 represents a new therapeutic target for MF.

Results

OGX-427 limits myelofibrosis progression in mouse models of MF. To assess the role of HSP27 in bone marrow fibrosis, we used two animal models recommended to study the establishment of the myelofibrotic features²⁴: the TPO^{high} and the *JAK2V617F* murine model (Figs. 1 and 2, respectively). These models

reproduce some myelofibrotic traits found in human primary MF^{22, 24}, such as megakaryocyte hyperplasia, anaemia, extra-medullary haematopoiesis, splenomegaly and myelofibrosis. Also, in both animal models there is sustained activation of JAK2/STAT signalling induced by the persistent production of TPO^{22, 25} or the constitutive active JAK2 mutant (*JAK2V617F*)²⁶ (Figs. 1a and 2a).

As shown in Fig. 1b, we clearly observed an increase of HSP27 level in the serum in the TPO^{high} model compared with wild-type mice. One month later, once the myelofibrosis-like features were established, mice were treated with the specific inhibitor of HSP27, OGX-427, using a validated non-toxic dose (10 mg kg⁻¹)¹⁴. These conditions induced a 65% decrease in HSP27 expression in splenocytes from OGX-427-treated mice compared with those from control (CTL) mice (i.e., treated with a non-relevant antisense oligonucleotide, Fig. 1c). Although OGX-427 treatment in this model had no direct effects on blood parameters (Supplementary Fig. 1a), it resulted in a marked reduction in spleen weight (30%) and size, a major criterion of treatment efficacy in humans (Fig. 1d, e). In agreement with this result, spleen sections revealed hyperplasia of the red pulp in TPO^{high} mice and partial restoration of the white pulp territories in OGX-427-treated mice compared to CTL (Fig. 1f). These results strongly suggest that OGX-427 treatment enable partial restoration of the normal splenic architecture. In addition, the decrease in erythropoiesis in the bone marrow was more pronounced in control mice than in OGX-427-treated mice, whereas megakaryocytic hyperplasia was less marked in OGX-427-treated mice than in controls (Fig. 1g), suggesting a beneficial effect of OGX-427 treatment on erythropoiesis and on the reduction in megakaryocytic expansion. It is worth noting that in our ethically approved protocol to study the effect of OGX-427 on myelofibrosis development, the animals were killed around 5 months after the beginning of the disease. However, even though the protocol was not adequate to study the effect of OGX-427 on animal survival, the few animals that died before the planned killing suggested an improved survival in the mice treated with OGX-427 (Supplementary Fig. 1b).

We next studied the effect of OGX-427 in the *JAK2V617F* transgenic mouse model, which has the advantage of being a better preclinical model for fibrosis studies²⁶ (Fig. 2). Twelve weeks after transplantation, *JAK2V617F* mice were treated with OGX-427 three times per week for 10 weeks (10 mg kg⁻¹) or not (control) (Fig. 2a). In accordance with the results obtained in the TPO^{high} mice model, OGX-427 treatment significantly reduced the weight of the spleen (Fig. 2b), induced a 50% decrease in HSP27 expression in the bone marrow compared with that from control mice (Fig. 2c) and limited megakaryocyte hyperplasia in the spleen and in the bone marrow (Fig. 2d). Of note, in this model, in the OGX-427-treated mice compared with controls, we observed a decrease in reticulin fibrosis in the bone marrow sections (Fig. 2e), and this was associated with a clear fall in platelet and white blood counts (i.e., back to normal levels at the end of the treatment). In contrast, these counts remained very high in the control group (Fig. 2f).

Altogether, these results suggest a beneficial effect of OGX-427 on the pathogenesis of myelofibrosis, both by limiting splenomegaly and megakaryocyte expansion, and by reducing fibrosis development.

Impact of HSP27 on the JAK2/STAT5 pathway in *JAK2V617F*-positive cells. Since HSP27 depletion has a beneficial impact on disease progression, we explored whether HSP27 plays a role in the proliferative effect of JAK2/STAT5. HSP27 was depleted by means of two specific small interfering RNAs (siRNAs), a small

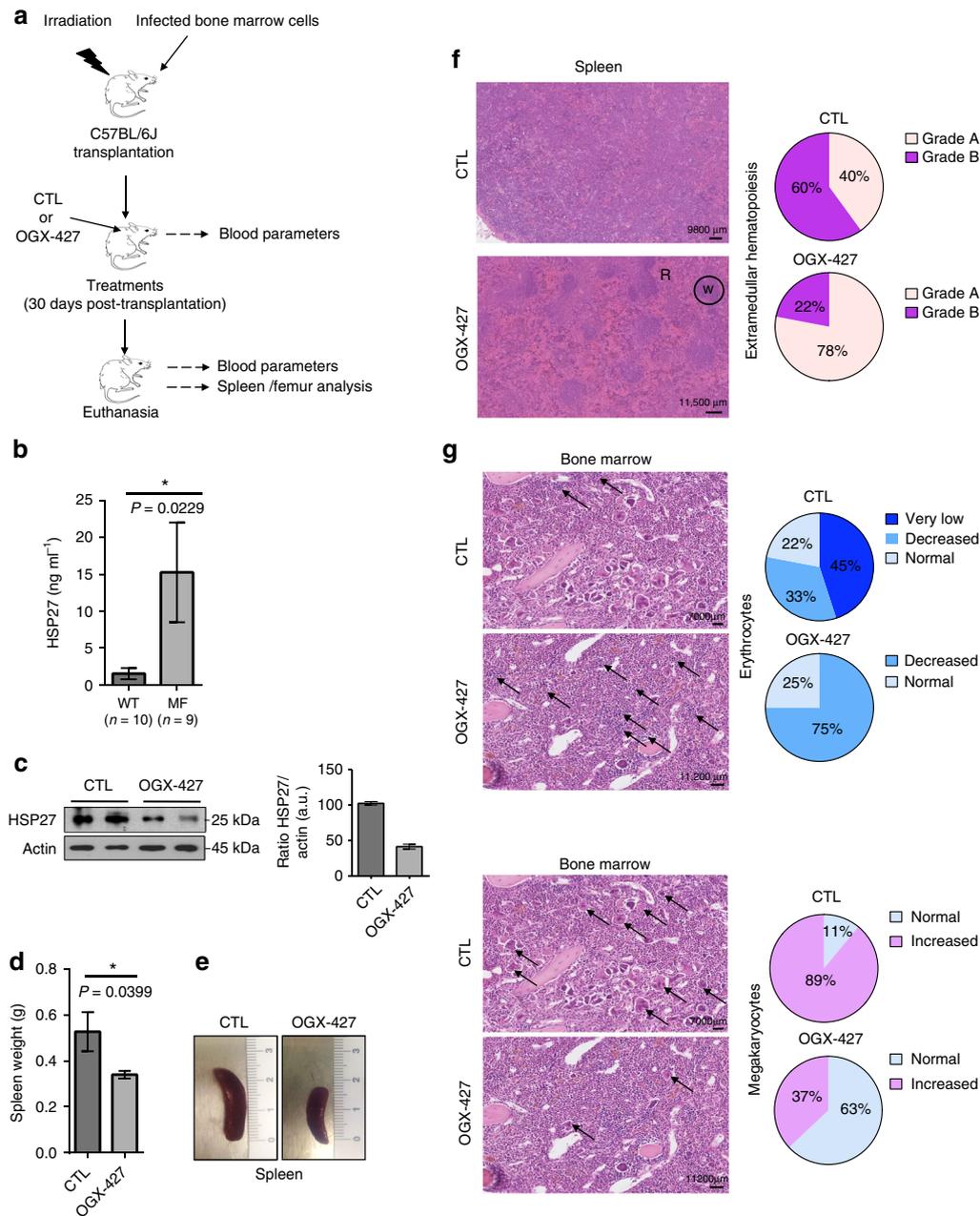
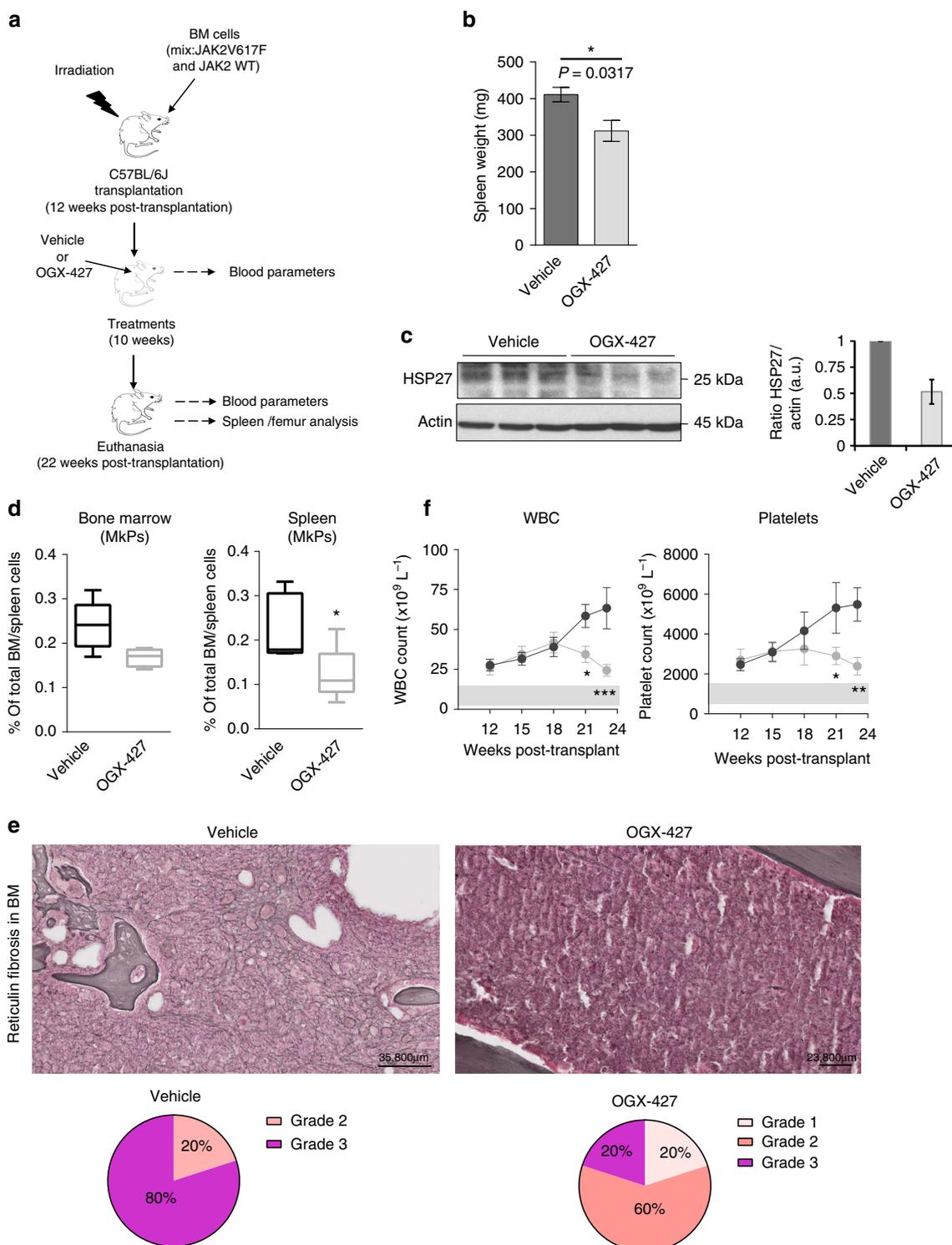


Fig. 1 HSP27 downregulation impairs myelofibrosis progression in a TPO^{high} murine model. **a** In vivo strategy of HSP27 inhibition using OGX-427, or a scrambled oligonucleotide control (CTL) injected intraperitoneally 3 times a week at a dose of 10 mg kg⁻¹ in a TPO^{high} murine model of myelofibrosis (MF). Mice were 2–4 months old. **b** Expression level of HSP27 proteins in the serum of TPO^{high} mice (n=9) compared with healthy mice (WT, n=10) measured by ELISA assay. *P* value was calculated using the Mann–Whitney test. **P* < .05. Error bars represent ±s.e.m. **c** Western blot analysis of HSP27 in splenocytes (whole cell lysate) of MF mice treated with OGX-427 or CTL. Actin served as the loading control. Bar graphs show quantification of mean relative amount of the proteins (n=2 per group). Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 7a **d** Spleen weight was evaluated in mice (n=9 per group). Outcomes of the two treatments were compared using the Mann–Whitney test. **P* < .05. Error bars represent ±s.e.m. **e** Representative picture of spleen size of MF mice treated with CTL or OGX-427. **f** Left panel, haematoxylin and eosin-stained spleen sections revealed hyperplasia of the red pulp (R) in MF mice and partial restoration of the white pulp (W) territories in OGX-427-treated mice. Right panel, assessment of the grade of extramedullary haematopoiesis (EMH), from spleen sections in 18 killed mice. Pie chart: Grade A (light pink): diffuse EMH invasion. Grade B (purple colour): diffuse EMH invasion with atrophy of white pulp. Images were obtained using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu, France) at ×23 magnification and Calopics software. **g** Left panel, histology of bone marrow sections after haematoxylin and eosin staining. Right panel, Pie chart representing percentages of mice according to erythrocyte (right upper panel) and megakaryocyte counts (right lower panel) from bone marrow sections of 18 killed mice: very low cell number (dark blue), decreased cell number (azure blue), normal cell number (light blue) and increased cell number (pink). Arrows show erythrocyte foci and megakaryocytes. Images were obtained using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu, France) at ×13 magnification and Calopics software

hairpin RNA (shRNA) or OGX-427 in two leukaemic cell lines, HEL92.1.7 (erythroleukaemia cell line) and SET-2 (megakaryoblastic cell line), which bear the *JAK2V617F* mutation that constitutively activates the JAK2 signalling pathway. HSP27 depletion by the three different approaches affected cell proliferation induced by the constitutively activated *JAK2* mutant (Fig. 3a, Supplementary Fig. 2a, b), but not apoptosis (Supplementary Fig. 2c), with a more pronounced effect on the megakaryoblastic SET-2 cell line (Fig. 3a). It is worth noting that HSP27 depletion had no effect on the proliferation of the *JAK2V617F*-negative cell line K562, suggesting that HSP27 plays

a role in *JAK2V617F*-positive cell proliferation. Our rescue experiments in the shRNA HSP27-depleted HEL92.1.7 cell line confirmed the implication of HSP27 in the cell proliferation (Supplementary Fig. 3a). An effect of HSP27 on cell proliferation was also observed on primary cells from patients by performing an erythroid colony formation assay. We found that HSP27 depletion by means of a specific shRNA induced a decrease in burst-forming units–erythroid (BFU-E) from MPN patients along with a specific effect on *JAK2V617F* cells (Supplementary Fig. 3b-d).

At the molecular level, depletion of HSP27 decreased the amount of phosphorylated STAT5 (Fig. 3b). Consequently, the



expression of the STAT5 target c-MYC, a modulator of proliferative signals, was reduced (Fig. 3b and Supplementary Fig. 2b). To investigate how HSP27 impacted phosphorylated STAT5 content, we performed both phosphorylation and de-phosphorylation *in vitro* assays. We found that while recombinant HSP27 did not affect the phosphorylation of STAT5 by JAK2 (Fig. 4a), it did affect its de-phosphorylation by tyrosine phosphatase SHP2 (a main phosphatase involved in STAT5 tyrosine de-phosphorylation)^{27–29} (Fig. 4b). In keeping with these results, AG490, an inhibitor of JAK2 activation³⁰, induced a faster de-phosphorylation of STAT5 in HEL92.1.7 cells depleted for HSP27 than in control cells (Fig. 4c).

We next performed *in vitro*, *in cellulo* and *in situ* experiments to determine whether HSP27 interacted with JAK2/STAT5. Using biolayer interferometry, we showed that recombinant JAK2 and STAT5A/B interacted directly with immobilized biotinylated HSP27 within the same range as Crystallin alpha B (CRYAB), a well-known partner of HSP27 used here as a positive control³¹ (Fig. 5a, Supplementary Fig. 4a–f).

JAK2 or STAT5 association with HSP27 was next determined by co-immunoprecipitation experiments using endogenous (Fig. 5b, c and Supplementary Fig. 5a) or exogenous tagged proteins (Supplementary Fig. 5b, c). In line with the biolayer interferometry results, HSP27 interacted with JAK2 and with STAT5.

We then confirmed these results by proximity ligation assay (PLA), by analysing the interaction between JAK2 or STAT5 and HSP27 within the HEL92.1.7 cells (Fig. 5d). The number of detected interaction foci per cell was significantly lower in siRNA HSP27 transfected than in control HEL92.1.7 cells (Fig. 5d). Using the same approach, we determined whether HSP27 affected the interaction between JAK2 and STAT5. As shown in Fig. 5d, depletion of HSP27 by siRNA significantly decreased the association between JAK2 and STAT5.

Altogether, our results indicate that the chaperone HSP27 is involved in the proliferative effect of JAK2/STAT5. HSP27, as previously shown with other HSP27 client proteins^{32–34}, protects STAT5 from its de-phosphorylation and might also favour the molecular assembly JAK2/STAT5.

Patients with MPN-associated MF display high HSP27 levels.

On the basis of our previous *in vivo* and *in vitro* results, we determined the expression levels of HSP27 in patients with an MPN-associated MF. In this type of MF, acquired mutations (*JAK2V617F*, *calreticulin* (*CALR*) or *MPL* mutations) constitutively induce JAK2 signalling pathways.

As a first approach, we used flow cytometry to evaluate the HSP27 levels in CD34⁺ circulating hematopoietic progenitor cells (HPCs) isolated from the blood of MF patients and healthy donors (HDs). We observed that HSP27 levels in CD34⁺ HPCs from MF patients were significantly higher than those in HDs (Fig. 6a). In contrast, HSP70 and HSP90 levels within CD34⁺HPC

in MF patients were not different from those in HDs. Knowing that HSPs can also be secreted, we assessed the extracellular content of HSPs in serum from MF patients by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Again, significantly higher levels of HSP27 were detected in the serum of MF patients than in serum from HD as previously observed in our TPO^{high} mouse model of myelofibrosis (Fig. 6b). High levels of extracellular HSP27 have also been reported in diseases involving chronic inflammation^{35,36}, an important process in the clonal evolution of MPN^{37,38}. Notably, increased HSP27 levels in HPCs and in serum from patients were detected independently of *JAK2V617F*, *CALR* or *MPL* mutations (Supplementary Table 1), all three mutant proteins that are indeed known to constitutively activate the JAK2/STAT pathway. HSP70 levels in patient serum were again not different from those in HDs (Fig. 6a, b). In contrast, HSP90 levels in serum samples were higher in MF patients than in HDs, highlighting the involvement of HSP90 in MPN^{39,40} (Fig. 6b).

In line with the results described above, HSP27 was strongly expressed in bone marrow biopsies from MF patients, whereas only a few myeloid cells were positive for HSP90 and none for HSP70 (Fig. 6c). More precisely, HSP27 was detected in megakaryocytes and in endothelial cells (Fig. 6c). Previous studies also reported increased levels of HSP27 in endothelial cells from fibrotic tissues⁴¹ and in MF megakaryocyte progenitors⁴². Altogether, these results suggest that HSP27 is a potential new player in MPN-associated MF.

Discussion

Myelofibrosis is a severe degenerative disorder for which no curative treatment exists, except bone marrow allograft⁴³. Although JAK2 inhibitors have given rise to high expectations, clinical studies, which had beneficial effects on the symptoms, demonstrated limited effects on the progression of the disease^{44,45}. Because HSP90 is known to stabilize JAK2 and therefore is a potential therapeutic target in JAK2-dependent MPN associated with MF, inhibitors of HSP90 have also been explored (currently in clinical phase II)^{39,40}. In the present work, we demonstrated that another essential chaperone, HSP27, is a therapeutic target of remarkable interest.

Inhibitors of HSPs, particularly of HSP90 and HSP27, are currently being tested in clinical trials as chemo- and radio-sensitizing agents, in many different cancer therapy protocols (reviewed in refs. 5, 46, 47). The rationale for targeting HSPs in cancer is provided by the fact that cancer cells have a strong need in chaperones (i.e., HSPs) for their survival, because they need to rewire their metabolism. However, HSP90 inhibitors, probably due to their toxicity, induce the compensatory expression of stress-inducible HSPs (i.e., HSP70, HSP27), which, through their cell survival function, may hamper HSP90 inhibitor effectiveness^{40,48}. The HSP27 inhibitor used in this work, an antisense oligonucleotide of generation (OGX-427, in phases I and II in cancer), is a very selective inhibitor, with no or negligible

Fig. 2 HSP27 downregulation impairs myelofibrosis progression in a *JAK2V617F* murine model. **a** *In vivo* strategy of HSP27 inhibition using OGX-427 or a vehicle, injected intraperitoneally 3 times a week at a dose of 10 mg kg⁻¹ in a *JAK2V617F* murine model of myelofibrosis (MF). Mice were 2 months old. **b** Spleen weight was evaluated in mice (*n*=5 per group). Outcomes of the two treatments were compared using the Mann-Whitney test. **P* < .05. Error bars represent ±s.e.m. **c** Western blot analysis of HSP27 in bone marrow (whole cell lysate) of MF mice treated with OGX-427 or vehicle. Actin served as the loading control. Bar graphs show quantification of mean relative amount of the proteins (*n*=3 per group). Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 7a. **d** Percentage of megakaryocytes progenitors (MkPs) present in the bone marrow or spleen, error bars represent ±s.e.m. (*n*=5 per group). *P* values were calculated using the Mann-Whitney test. **P* < .05. **e** Upper panel, Gordon and Sweet-stained bone marrow sections revealed reduced reticulin fibrosis in MF mice and in OGX-427-treated mice. Lower panel, assessment of the fibrosis grade from bone marrow sections of 5 mice per group. Pie chart: Grade 1 (light pink): few thin reticulin fibres. Grade 2 (light red): networks of thin reticulin fibres. Grade 3 (purple): dense network of thick reticulin fibres. Images were obtained using a Nanozoomer scanner (Hamamatsu, France) at ×23 magnification and Calopics software. **f** Blood cell parameters assessed in mice before and after OGX-427 (*n*=5) or vehicle treatment (*n*=5) and on the day of killing. WBC white blood cells. Error bars represent ±s.e.m. *P* values were calculated using the Mann-Whitney test. **P* < .05; ***P* < .01. ****P* < .001

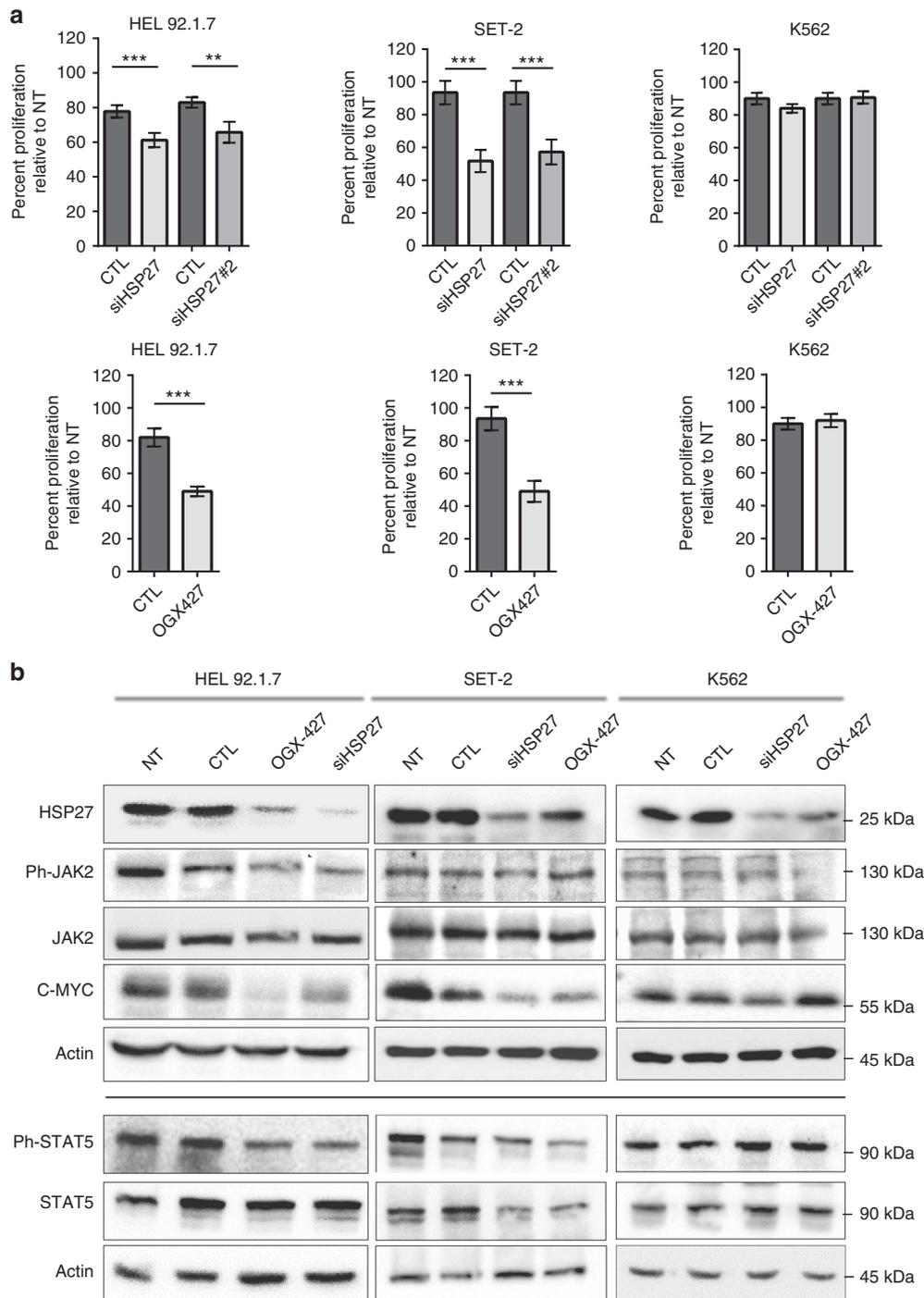


Fig. 3 HSP27 affects proliferation of *JAK2V617F* leukaemic cell lines. **a** HEL92.1.7, SET-2 and K562 cells were transfected with HSP27 siRNA, OGX-427 or an oligonucleotide control (CTL). Bars represent cell proliferation percentages relative to non-transfected cells (NT) from 9 independent experiments. *P* values were calculated using the Mann-Whitney test. ****P* < .01. Error bars represent \pm s.e.m. **b** HEL92.1.7, SET-2 and K562 cells were transfected with HSP27 siRNA, OGX-427 or CTL and lysed 48 h later in Laemmli Buffer. Protein expression was determined by western blot and compared to non-transfected cells (NT). Actin was used as the loading control (*n*=3 independent experiments). See quantification of the blot in Supplementary Fig. 2b. Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 7b-f

toxicity. Moreover, in contrast to HSP90 inhibitors^{49, 50}, it does not induce the compensatory expression of other HSPs. Indeed, OXG-427 did not induce HSP90 or HSP70 expression in any of our models, i.e., *TPO*^{high} mice, or *JAK2V617F*-positive (HEL92.1.7 and SET-2) and -negative (K562) cell lines (Supplementary Fig. 6).

OGX-427 limited the progression of bone marrow fibrosis in the *JAK2V617F* model, but not in the *TPO*^{high} model (Fig. 2e). In

accordance with anterior published work, Fedratinib (a selective JAK2 inhibitor for which clinical studies have been hindered because of its toxicity) also decreased splenomegaly without affecting fibrosis in this *TPO*^{high} murine model, whereas it impaired fibrosis in the post-polycythemia vera myelofibrosis murine model^{51, 52}. The differences in results obtained, using different mouse models, might be explained by the fact that the process of fibrosis in the *TPO*^{high} model is very rapid and

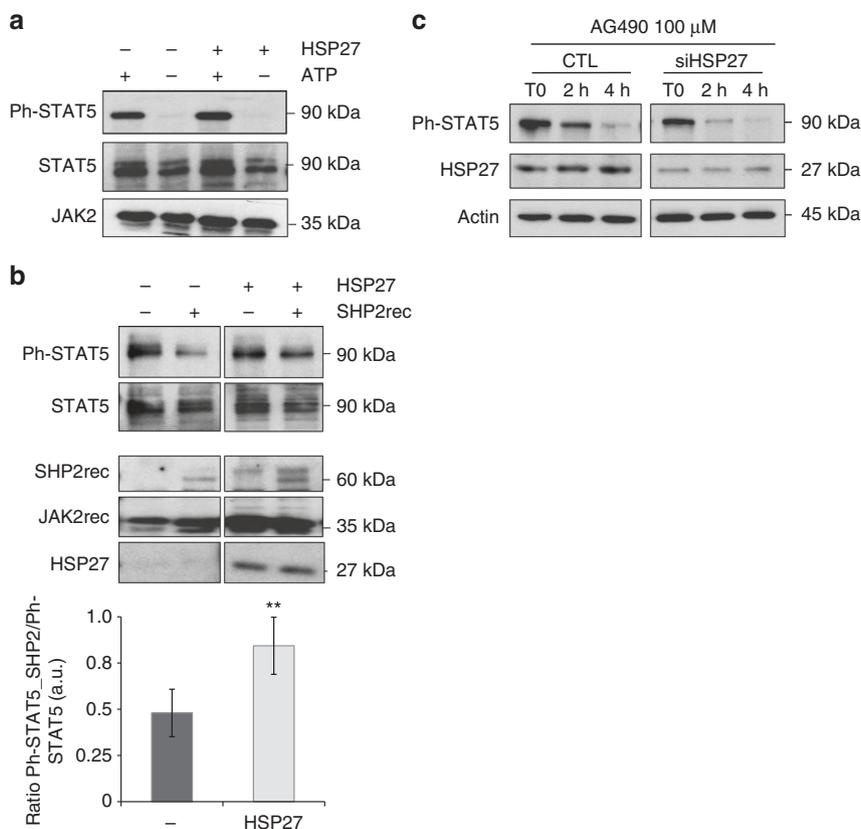


Fig. 4 HSP27 affects de-phosphorylation of STAT5. **a** The phosphorylation of STAT5 by JAK2 is HSP27 independent. An in vitro kinase assay was performed using the recombinant protein JAK2 and STAT5 (produced in reticulocyte lysate) in the presence or absence of HSP27 (produced in reticulocyte lysate). The level of STAT5 phosphorylation, and the amount of JAK2 and STAT5 proteins were determined by western blot ($n=3$ independent experiments). Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 8a. **b** HSP27 impairs the in vitro de-phosphorylation of STAT5 induced by SHP2. Following an in vitro kinase assay using the recombinant protein JAK2 and STAT5 (same batch produced in reticulocyte lysate), samples were incubated or not with the recombinant phosphatase, SHP2, in the presence or absence of HSP27 (produced in reticulocyte lysate). The level of phosphorylated STAT5 was detected by western blot using an antibody specific for Ph-STAT5. The expressions of JAK2, SHP2 and HSP27 are also shown. Bar graphs show normalized ratios of Ph-STAT5_SHP2/Ph-STAT5 bands quantified from the western blots ($n=4$ independent experiments), error bars represent the \pm s.d. P values were calculated using the Student's t test. $**P < .01$. Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 8b. **c** HEL92.1.7 cells were transfected with HSP27 siRNA or CTL for 48 h. Then, cells were treated or not with the JAK2 inhibitor, AG490 (100 μ M), at indicated times and lysed in Laemmli Buffer. Level of STAT5 phosphorylation was determined by western blot. Actin was used as the loading control ($n=3$ independent experiments). Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 8c

irreversible^{22, 25} compared to other models. Despite the limits of this TPO^{high} model of MF, we nonetheless succeeded to demonstrate the effectiveness of OGX-427, not only on splenomegaly, but also on extramedullary hematopoiesis. This suggests a potential implication of HSP27 in the migration of bone marrow stem cells, from the medullary niche to extramedullary foci.

It has been shown that HSP27 is overexpressed in fibrotic conditions such as pulmonary or renal fibrosis^{16, 53, 54}. For instance, we previously unravelled the overexpression of HSP27 in the pleura of patients with pulmonary fibrosis, as well as in two rat models of idiopathic pulmonary fibrosis¹³. The identification, in the present work, of HSP27 overexpression in MF patients (Fig. 6a–c), as well as in mouse models of MF (Figs. 1 and 2), again supports association between HSP27 and fibrotic pathologies. How HSP27 impacts myelofibrosis development is not yet understood, but it may involve the JAK2/STAT5 signalling pathway. Indeed, our results demonstrate that HSP27 interacts directly with JAK2 and STAT5 (Fig. 5a–d), probably favouring their assembly into a stable complex, and protecting STAT5 from its de-phosphorylation (Fig. 4b, c). Additionally, we show that HSP27 is involved in the proliferation of *JAK2V617F* cells and the

expression of c-MYC (Fig. 3b), a downstream target of STAT5 and a known actor in fibrosis development^{55, 56}. Interestingly, the HSP70/90 co-chaperon STIP1 (stress-induced phosphoprotein 1) has been reported to be necessary for the control of the stability of the JAK2/HSP90/STAT3 complex⁵⁷, suggesting that JAK2/STAT5 activity is tightly regulated by different chaperones. Other signalling pathways might also be involved in the myelofibrotic process. In particular, it has been reported that stimulation of platelets by collagen leads to a HSP27-dependent release of platelet-derived growth factor (PDGF), a growth factor that participates in the pathogenesis of MF⁵⁸. In addition, aberrant expression of PDGF and its receptor (PDGF receptor alpha) has been identified in bone marrow cells of patients with idiopathic MF at the advanced stages of the disease⁵⁹.

Here, we also identify for the first time an extracellular increase of both HSP90 and HSP27 in the sera of MF patients (Fig. 6b), as well as of mice developing the disease (Fig. 1b). Although HSP90 extracellular function in MF remains to be studied, in cancer it has been reported to participate in carcinogenesis^{60, 61}. In the context of pathological remodelling heart, García et al.⁶² have shown that inhibition of extracellular HSP90 lessened the yield of

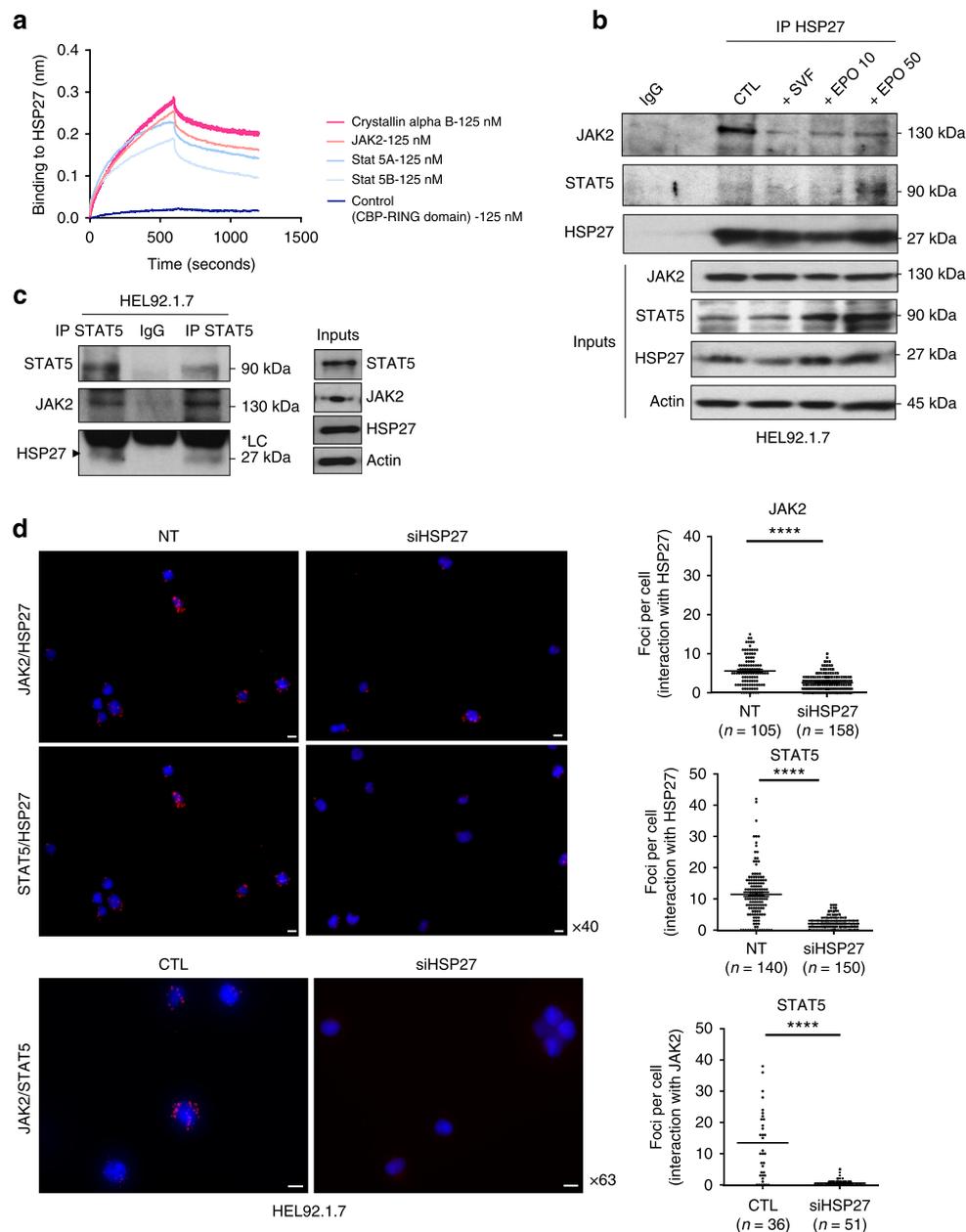


Fig. 5 HSP27 interacts with JAK2/STAT5. **a** The binding of recombinant JAK2 and STAT5a/b at 125 nM to immobilized biotinylated HSP27 was determined by biolayer interferometry. Crystallin alpha B and the CBP RING domain serves as a positive control and negative control, respectively (Supplementary Fig. 4a–c) ($n=3$ independent experiments). **b** Immunoprecipitation from HEL92.1.7 cell extracts of endogenous HSP27 was followed by immunodetection of endogenous STAT5 and JAK2. CTL: unstimulated cells starved for 16 h; +SVF: Cells starved for 16 h and then stimulated with SVF (10%) for 30 min. Inputs: proteins in total cell lysates. IP IgG: immunoprecipitation with a non-relevant antibody (IgG mouse) ($n=2$ independent experiments). Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 8d. **c** Immunoprecipitation of endogenous STAT5 was followed by immunodetection of endogenous HSP27 and JAK2. Inputs: proteins in total cell lysates. IP IgG: immunoprecipitation with a non-relevant antibody (IgG mouse) ($n=2$ independent experiments). Uncropped blots presented in Supplementary Fig. 8e. **d** Immunofluorescence analysis of the endogenous interaction (red foci) of JAK2 (upper panel) or STAT5 (middle panel) with HSP27 visualized in situ by PLA in HEL92.1.7 cells transfected or not (NT) with a HSP27 siRNA. Nuclei are stained with DAPI. Images were taken randomly and obtained using an Axio Imager 2 at $\times 40$ magnification and analysed using ICY software. Cells were segmented manually, and the number of interaction foci in each cell was counted using the spot detector plugin. Right panel, graphs represent quantification of the interaction of JAK2 or STAT5 with HSP27 visualized in situ by PLA. Each data point corresponds to an analysed cell, placed according to the number of detected interaction foci (lower panel). Immunofluorescence analysis of the endogenous interaction (red foci) of JAK2 with STAT5 visualized in situ by PLA in HEL92.1.7 cells transfected with a scramble (CTL) or a HSP27 siRNA (siHSP27). Nuclei are stained with DAPI. Images were obtained using an Axio Imager 2 at $\times 63$ magnification and analysed using ICY software as in upper panel. Right panel, graphs represent quantification of the interaction of endogenous JAK2 with STAT5 visualized by PLA. P values were calculated using the Mann-Whitney test. **** $P < .0001$. Scale bar 10 μm

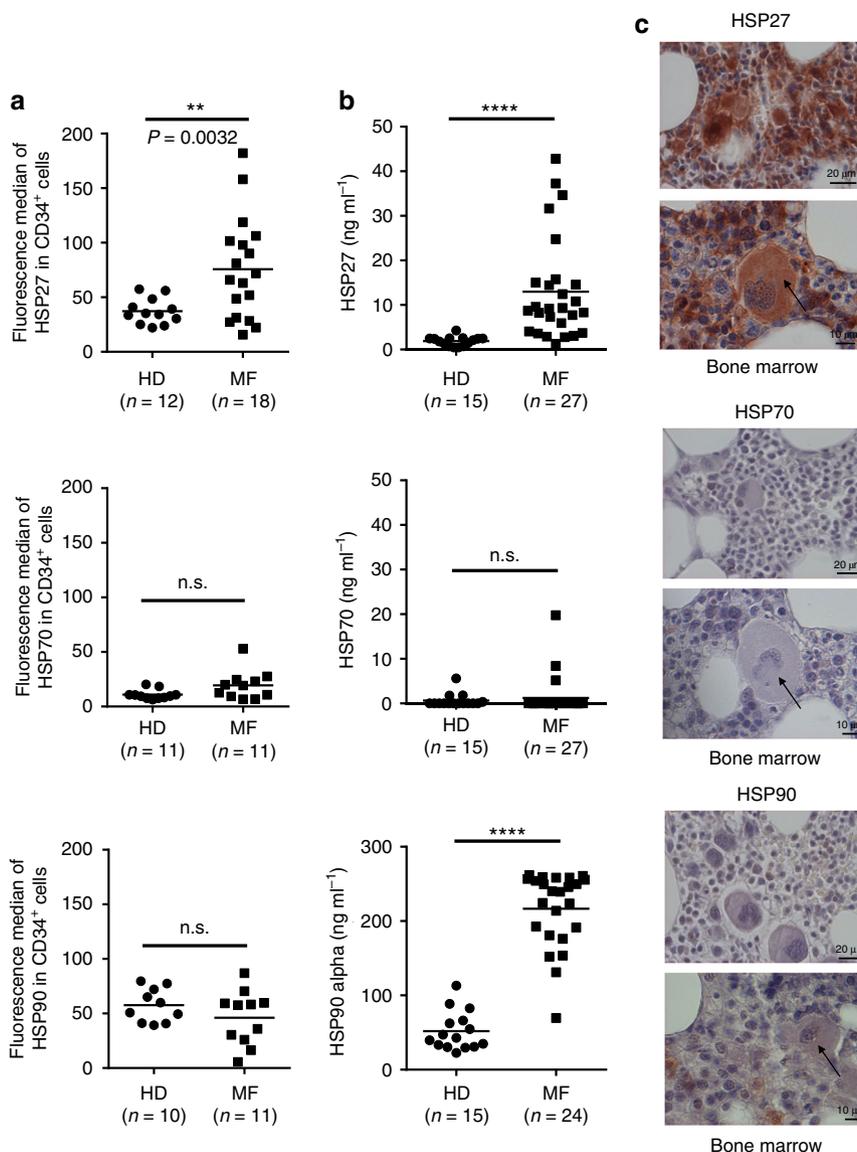


Fig. 6 HSP27 is overexpressed in patients with MPN-associated MF. **a** Flow cytometry analysis of HSP27, HSP70 and HSP90 in circulating hematopoietic progenitor CD34⁺ cells from patients with myelofibrosis (MF) and healthy control donors (HDs) (number of samples analysed; MF: $n=11-18$; HD: $n=10-12$). P values were calculated by using the unpaired t test with Welch's correction. ** $P < .01$; n.s. not significant. Expression levels of HSP27, HSP70 and HSP90 from MF patients were plotted as median fluorescence intensities. **b** Analysis of HSP27, HSP70 and HSP90 levels in the serum of patients with MF ($n=24-27$) compared with HDs ($n=15$) measured by ELISA. P values were calculated using the Mann-Whitney test. **** $P < .0001$. **c** Representative histological sections of bone marrow from MF patients. Images were obtained using Cell Observer (Zeiss, France) at two different magnifications ($\times 23$, scale bar 20 μm and $\times 63$, scale bar 10 μm) and Axiovision software. Arrows show megakaryocytes

collagen production as well as the canonical transforming growth factor β (TGF- β) signalling cascade. It has been demonstrated that extracellular HSP90 binds to the extracellular part of TGF β receptor I (TGF β RI) in cardiac fibroblasts, thereby inducing the canonical pathway of collagen production. Accordingly, *Hsp90* knockout mice showed a dramatic decrease in the production of collagen by fibroblasts in response to TGF- β stimulation⁶². These results highlight the existence of a functional cooperative partnership between HSP90 and TGF β RI in the fibrotic process. Since we also observed a marked increase in serum HSP90 levels in MF patients, this suggests that extracellular HSP90 might likewise play a role in the pathogenesis and/or could be used as a biomarker in MF⁶³.

Extracellular increase of HSP27 has already been observed in pathological conditions, such as chronic pancreatitis, pancreatic cancer or breast cancer⁶⁴⁻⁶⁶. However, in pulmonary and renal

fibrosis, in which a significant increase of intracellular HSP27 was previously reported, its levels in the patient's sera have not yet been investigated^{16, 53, 54}. The level of HSP27 in the extracellular medium is generally correlated with an increase in its intracellular concentration⁶⁷, which is observed under extreme conditions such as very intense physical effort⁶⁸ or pathological secretion by cancer cells^{11, 69, 70}. Accordingly, we show, here, that the high level of HSP27 in the serum of MF patients, compared to healthy donors, correlated with an increase in HSP27 intracellular levels in CD34⁺, megakaryocytes and endothelial cells (Fig. 6a, c). We believe that HSP27 secretion by these cells contributes to the high levels of HSP27 detected in the blood of MF patients, although we do not exclude that other types of cells may also participate to this process. In particular, it has already been shown that HSP27 can be released by human platelets under normal conditions⁷¹. Platelets might therefore also be involved in HSP27 secretion in the

context of MF, especially as they are deregulated in this disease⁴². Altogether, the increase in the expression of HSP27 observed in CD34+ HPC, as well as in the serum from MF-associated MPN patients, suggests that HSP27 is a potential therapeutic target in this disease.

To summarize, using two murine models of myelofibrosis, we show that a specific HSP27 inhibitor, OGX-427, limits the progression of myelofibrosis by (i) reducing both spleen weight and size, (ii) decreasing myeloid proliferation in the spleen and bone marrow, and by reducing megakaryocytic expansion, (iii) decreasing reticulin fibrosis and (iv) normalizing the platelet and white blood counts. We also show, for the first time, that HSP27 may chaperone JAK2/STAT5, a central signalling pathway activated in MF-associated MPN, and also in other kinds of diseases^{72,73}. Altogether, our results support a key role for HSP27 in the pathophysiology of MF and highlight a potential interest of HSP27 inhibitors as a complementary approach for MF-associated MPN treatment.

Methods

Reagents. OGX-427, a second-generation antisense oligonucleotide inhibitor (Patent PCT no. 10/605, 498, 2005; <http://ir.oncogenex.com/>) and the oligonucleotide control were synthesized by OncoGenex Pharmaceuticals. AG490 was purchased from Invivogen (100 μ M). Antibodies used for western blotting included anti-JAK2 (dilution 1:1000, clone D2E12, #3230), anti-phospho-JAK2 (dilution 1:1000, polyclonal, #3771), anti-STAT5 (dilution 1:1000, clone D2O6Y, #9363), anti-phospho-STAT5 (dilution 1:1000, clone D47E7, #4322) and anti-c-MYC (dilution 1:1000, polyclonal, #9402) purchased from Cell Signalling Technologies; anti-HSP27 (dilution 1:1000, polyclonal, SPA-803 (human); dilution 1:1000, clone G3.1, SPA801 (murine)), -HSP70 (dilution 1:1000, clone C92F3A-5, SPA-810) and -HSP90 (dilution 1:1000, clone AC88, SPA-830) were purchased from Enzo Life Sciences and anti-beta-actin-peroxidase (dilution 1:25000, clone AC15, A3854) from Sigma-Aldrich. Antibodies used for PLA included anti-HSP27 (dilution 1:100, clone G3.1, SPA-800); anti-JAK2 (dilution 1:100, clone D2E12, #3230); and anti-STAT5 (dilution 1:100, clone D2O6Y, #9363). Antibodies for flow cytometry included anti-CD34 PE-Cy7 (dilution 5:100, clone 8G12, #348811), -CD45 APC (dilution 20:100, clone HI30, #555485), -Mouse IgG FITC purchased from BD Biosciences and anti-HSP27 FITC (dilution 1:200, clone G3.1, SPA-800FI), -HSP70 FITC (SPA-810FI, clone C92F3A-5, dilution 1:100), -HSP90 Alexa 488 (dilution 1:10, clone AC88, SPA830-488) from Enzo Life Sciences. Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories. The two siRNAs against HSP27 (siRNA#1: 122371, "GUUCAAAGCAACCACUGUT", siRNA#2: S6991, "GCGUGUCCUGGAUGUCAAT") were purchased from Ambion and the siRNA control (Negative control #1) from Sigma-Aldrich.

Cell lines and transfections. The JAK2V617F-positive human leukaemic cell line HEL92.1.7 (ACC-11, from DSMZ) and SET-2 (ACC-608, from DSMZ), the JAK2V617F-negative human leukaemic cell line K562 (ACC-10, from DSMZ) and the human embryonic kidney (HEK293T) cell line (ATCC CRL-3216) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% (HEL92.1.7, K562 and HEK293T) or 20% (SET-2) v/v foetal bovine serum. The cell line GP+E-86 (ATCC CRL-9642) was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% v/v foetal bovine serum. All cell lines were tested for mycoplasmas. HEL92.1.7, SET-2 and K562 cells were transfected with siRNA against HSP27 (siHSP27), siRNA control (CTL) or OGX-427 using Amaxa Nucleofector system (Lonza) according to the suppliers' instructions.

Proliferation assay. Non-transfected (NT) cells and cells transfected with siHSP27, OGX-427 and siRNA control (CTL) were plated in 96-well plates in triplicate, 48 h post transfection, in 100 μ l of medium. Cell proliferation was determined by the cell proliferation assay (XTT, Roche). Briefly, 50 μ l of XTT labelling mixture was added in each well for 4 h and cell proliferation was determined by absorption at 490 nm with a reference wavelength at 650 nm.

Western blot analysis. Protein extracts from cells and spleen tissues were prepared using a modified Laemmli buffer (5% sodium dodecyl sulphate, 10% glycerol, 32.9 mM Tris-HCl pH 6.8) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Then, 30 μ g of proteins from each lysate were subjected to migration on 8–12% acrylamide gels and transferred on to polyvinylidene difluoride membranes (GE Healthcare Europe GmbH) in borate buffer (50 mM Tris-HCl and 50 mM borate) for 1 h and 45 min at constant voltage (48 V). The membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4 °C, then washed in Tris-buffered saline-Tween 0.1% and incubated for 1 h with horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibody or beta-actin peroxidase antibody (Sigma-Aldrich). The signal was revealed using a chemiluminescent reagent (Luminata Crescendo

Western HRP substrate reagent, Merck Millipore) and was detected using a ChemiDoc XRS System (Bio-Rad). Uncropped blots are presented in Supplementary Fig. 7, 8.

Protein interaction studies. For in vitro interaction experiments, we used biolayer interferometry technology (Octet Red, Forté-Bio). Recombinant HSP27 (ADI-ESP-715, Enzo-Life Sciences (produced in *Escherichia coli*, low endotoxin)) was desalted (Zeba™ Spin Desalting Columns, 7K molecular-weight cutoff, 0.5 ml (1034–1164, Fisher Scientific)) and biotinylated at a molar ratio biotin/protein (3:1) for 30 min at room temperature (EZ-Link NHS-PEG4-Biotin (1189–1195, Fisher Scientific)). Excess Biotin was removed using Zeba™ Spin Desalting Columns. Biotinylated recombinant HSP27 was used as a ligand and immobilized at 10 μ g ml⁻¹ on streptavidin biosensors after dilution in phosphate-buffered saline (PBS; 600 s). Interactions with desalted analytes diluted in PBS at 125 nM (recombinant STAT5a/b (TP305753 and TP309429 respectively, Origen), JAK2 (TP320503, Origen) or the RING domain of CBP (gift from Dr. Rodrigues-Lima used as a negative control⁷⁴ or crystallin alpha B as a positive control (ADI-SPP-228, Enzo-Life Sciences)) were analysed after association (600 s) and dissociation (600 s) steps at 26 °C. The specificity of the BLI experiments was tested and validated as shown in Supplementary Fig. 4d-f.

For in vitro immunoprecipitation, recombinant proteins were produced using TNT Quick Coupled Transcription/Transcription System (L1170, Promega) as follows: 1 mg of template plasmid DNA was added to the reaction mixture, which was afterwards incubated at 30 °C for 90 min. The in vitro translated proteins were incubated for 15 min at 37 °C in buffer (Hepes pH 7.4 10 mM, NaCl 25 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 5 mM, dithiothreitol (DTT) 1 mM, protease and phosphatase inhibitors) and then subjected to immunoprecipitation for 1 h and 30 min at RT using an anti-mouse HSP27 antibody (2 μ g, clone G3.1, SPA-800, Enzo Life Sciences) or a mouse IgG (serum, I5381, Sigma-Aldrich) as a negative control that were pre-incubated 1 h at RT with Protein G UltraLink Resin (53132, Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2X laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 8–12% SDS-PAGE and immunoblots were performed using an anti-rabbit STAT5 (#9363, Cell Signalling technologies).

For endogenous interaction experiments, we performed co-immunoprecipitations and proximity ligation assays (PLA) in HEL92.1.7 cells. For co-immunoprecipitation, when indicated, HEL92.1.7 cells were first deprived of serum for 16 h and then stimulated for 10 min with 10% serum or increasing doses of erythropoietin (EPO, 15 and 50 UI per ml). Cells were lysed in Lysis buffer (50 mM Hepes pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Triton X-100 0.1%, Glycerol 10%, 0.25 mM DTT, NaVO₄ 10 mM, NaF 10 mM, proteases inhibitors). Precleared cell lysates were subjected to immunoprecipitation for 3 h using an anti-mouse HSP27 antibody (2 μ g, SPA-800, Enzo Life Sciences) or anti-STAT5 mouse (4 μ g, clone A-9, sc-74442, Santa-Cruz) or a mouse IgG (I5381, Sigma-Aldrich) as a negative control that had been pre-incubated for 1 h at room temperature (RT) with Protein G UltraLink Resin beads (53132, Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2X laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 8–12% sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblots were performed using an anti-rabbit STAT5, JAK2 or HSP27 antibody. For PLA, HEL92.1.7 cells transfected or not with HSP27 siRNA#1 or control siRNA were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in chilled methanol, blocked with 3% bovine serum albumin, then incubated overnight with anti-HSP27 and -JAK2 or -STAT5 antibodies. PLA was carried out according to the supplier's instructions (Olink). Cells were mounted with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) containing prolong diamond (Life Technologies). Interactions between JAK2 or STAT5 and HSP27 were visualized in situ using an axio imager 2 (Zeiss, France) and analysed using ICY software.

For endogenous immunoprecipitation, SET-2 cells were lysed in Lysis buffer (50 mM Hepes pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Triton X-100 0.1%, Glycerol 10%, 0.25 mM DTT, NaVO₄ 10 mM, NaF 10 mM, proteases inhibitors). Precleared cell lysates were subjected to immunoprecipitation overnight using an anti-STAT5 mouse (4 μ g, clone A-9, sc-74442, Santa-Cruz) or an anti-HSP27 rabbit (3 μ g, polyclonal, SPA-803, Enzo Life Sciences) with a mouse or a rabbit IgG (I5381/I5006, Sigma-Aldrich), respectively, as a negative control that were pre-incubated 1 h at RT with Protein G UltraLink Resin beads (53132, Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2X laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 10% SDS-PAGE and immunoblots were performed using an anti-rabbit STAT5, JAK2 (clone D2O6Y, #9363 and clone D2E12, #3230, Cell Signalling technologies) or HSP27 antibody (polyclonal, SPA-803, Enzo Life Sciences).

For exogenous immunoprecipitation, HEK293T cells were transfected with HA-tagged HSP27 and Myc-tagged STAT5a or JAK2V617F constructs. After 24 h, cells were lysed in Lysis buffer (50 mM Hepes pH8, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, Triton X-100 0.1%, Glycerol 10%, 0.25 mM DTT, NaVO₄ 10 mM, NaF 10 mM, proteases inhibitors). Precleared cell lysates were then subjected to immunoprecipitation for 3 h using an anti-mouse HA-tag (HSP27) (clone H-7, H3663, Sigma-Aldrich) or anti-mouse Myc-tag (clone 9B11, #2276, Cell Signalling technologies), STAT5 antibody (clone A-9, sc-74442, Santa-Cruz) or a mouse IgG as a negative control (serum, I5381, Sigma-Aldrich) that were pre-incubated for 1 h at RT with Protein

G UltraLink Resin beads (53132, Pierce). Protein complexes were then washed 4 times in lysis buffer and suspended in 2× Laemmli buffer. After boiling, the immunoprecipitates were resolved in 8–12% SDS-PAGE and immunoblots were performed using an anti-rabbit STAT5, JAK2 or HSP27 antibody.

shRNA production and cell infection. For shRNA experiments, the sequence for shRNA targeting human HSP27 (forward-gatccccc (GATCACCATCCCAGT-CACCTT, sense) tcaagaga (AAGGTGACTGGGATGGTGATC, antisense) tttttggaaa and reverse-agcttttcaaaaa (GATCACCATCCCAGT-CACCTT, sense) tctctgaa (AAGGTGACTGGGATGGTGATC, antisense) ggg) (Eurofins Genomics) was cloned in the pRRLsin-PGK-eGFP-WPRE vector (Addgene, #12252) using a shuttle vector pH1 and the ligase T4 DNA (M0202, New England Biolabs). Ligation products were transformed in XL10-Gold® Ultracompetent Cells (50-125-094, Aligent Technologies). Bacteria were incubated at 32 °C overnight. pRRL-shRNA-HSP27 final product was checked by sequencing (Genewiz, Takelay, UK). Lentivirus particles were produced in HEK293T cells after transfection of the cells with the plasmids pRRL-HSP27 (15 µg), psPAX2 (10 µg, 122160, Addgene) and pMD2.G (5 µg, 12259, Addgene) using the calcium chloride transfection method. Viral particles were concentrated by ultracentrifugation (45 min, 20,000 × g). HEL92.1.7 cells were then transduced with lentivirus particles (1.2.10⁶ U per 500,000 cells) encoding shRNA for HSP27 and sorted for green fluorescent protein (GFP) on ARIA III cytometer.

Phosphorylation and de-phosphorylation assays. For the phosphorylation assay, STAT5 (produced in reticulocyte lysate) was incubated for 15 min at 30 °C in the presence or absence of HSP27 (produced in reticulocyte lysate) with JAK2 recombinant kinase (50 ng, 14-640, Merck Millipore) in a 15 µl of assay kinase buffer (Hepes pH 7.4, 10 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, NaF 10 mM) in the presence or absence of ATP (250 µM, #9804, Cell Signalling Technology) and the reaction was stopped by adding 2× Laemmli buffer.

In vitro transcription and translation reactions were performed using TNT Quick Coupled Transcription/Transcription System (L1170, Promega) as recommended by the supplier. Next, 1 µg of the plasmid DNA template was transcribed and the protein was translated at 30 °C for 90 min.

For the de-phosphorylation assay, a phosphorylation kinase assay JAK2/STAT5 was first done in the presence of ATP as described above and the reaction was stopped by adding 20 µM of Ruxolitinib (sc-396768A, Santa-Cruz) for 5 min. Then, HSP27 (produced in reticulocyte lysate) was added or not to the samples and incubated for 10 min at 30 °C. The recombinant SHP2 (590 ng, SRP0217, Sigma-Aldrich) was added or not to the samples for 12 min at 30 °C and the reaction was stopped by adding 2× Laemmli buffer.

Murine models and analysis of mice. For the TPO^{high} murine model, specific pathogen-free C57BL/6J female mice between 2 and 4 months of age were purchased from Janvier (Lyon, France) and maintained in sterile housing in accordance with the guidelines of the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Paris, France). Rodent laboratory food and water were provided ad libitum. All experiments were granted by the ethics committee CE26 (Paris, license D94-076-11SCEA; IGR 23-11-12 2012-061). All animal procedures were performed with inhalation anaesthesia with isoflurane (TEM, Lormont, France). To generate the TPO^{high} model, mice were lethally irradiated (9.5 Gy, 60 Co gamma rays) and animals were injected intravenously (IV) with 1 to 5 × 10⁶ transduced bone marrow cells (retrovirus MPZenTPO)^{22, 25}. The infection of bone marrow cells was done as follows: 4 days after 5-fluorouracil injection in mice (150 mg kg⁻¹ administered IV), bone marrow cells (from two femurs) were co-cultivated with 1 × 10⁵ MPZenTPO-producing GP/E-86 cells in media containing DMEM (20 ml), 20% foetal calf serum (FCS), 10% pokeweed mitogen-stimulated spleen cell conditioned medium (PWM-SCM), in a 100 mm tissue culture petri dish. After 4–5 days, nonadherent cells were harvested and injected into lethally irradiated mice. The mice were randomized based on blood count 30 days after transplantation and injected intraperitoneally, three times per week, with 10 mg kg⁻¹ OGX-427, or a control oligonucleotide. TPO^{high} mice were treated for 5 weeks and euthanized 4 weeks after the last injection (Fig. 1a).

For the JAK2V617F murine model, bone marrow cells (2 × 10⁶ per recipient) from 2-month-old female C57BL/6J mice (control mice, Harlan Laboratories) and ScfCre;FF1;GFP mice were transplanted into 2-month-old female C57BL/6J lethally irradiated recipients (5 mice per group) in a 1:1 ratio²⁶. At 12 weeks post transplantation, a first blood cell count was done to check and confirm the MPN phenotype. The animals were then divided into two groups of five mice: one group was treated with the vehicle alone (3 times per week) and the other mice were treated with the HSP27 inhibitor OGX-427 (10 mg kg⁻¹; 3 times per week). The mice were treated for 10 weeks and cell blood count was performed every 3 weeks. At the end of the experiment, the mice were killed, and spleens were weighed and stored at -20 °C. The female mice had free access to food and water and were kept under specific pathogen-free conditions (laboratory animal husbandry license CH-1007H). Animal experiments were done in strict compliance with Swiss laws for animal welfare and were authorized by the Swiss Cantonal Veterinary Office of Basel-Stadt, license 2581.

For the two models, haematocrit, platelet and white blood cell (WBC) counts were determined using an automated counter (Scil Vet abc Plus+, Horiba) on

blood collected from the tails in EDTA tubes throughout the study. At the end of the study, spleens were weighed, measured and stored in 4% paraformaldehyde for histopathology studies or frozen at -20 °C for western blot analysis. The concentration of HSP27 in serum from control mice was measured by ELISA at 3 months after the transplantation. For bone marrow analysis, femurs were collected, fixed in 4% phosphate-buffer formalin, embedded in paraffin and sectioned. Tissue sections were stained with haematoxylin and eosin for morphology analysis, which was performed in a blinded fashion. Images were organized in folders identified by letters by one person and quantified by another. A minimum of *n* = 5–9 mice were used for each experiment, which was sufficient to provide adequate power for these experiments (inVivoStat analysis).

Patient's samples. Patient samples (serum, blood and histological section) were obtained from the University Hospital of Dijon and Gustave Roussy (France). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki with an approved written consent form for each patient (CPP ESTI: 2014/39; N°ID: 2014-A00968-39), and approval was obtained from the local ethics committee ESTI (license: NCT02873832).

Flow cytometry. To determine the number of megakaryocytes in the bone marrow and spleen, the cells were isolated and resuspended in lysing buffer (ACK Lysing Buffer, Bio Whittaker, Lonza) followed by incubation at RT for 10 min. After RBC lysis, cells were pelleted by centrifugation, resuspended in FACS staining medium (PBS+5% FCS) and filtered through 100 µm cell strainer (Falcon, #352360). Cells were stained with biotin-labelled mouse lineage antibodies (anti-Ter119 (clone Ter119, #116203), anti-B220 (clone RA36B2, #103203), anti-CD4 (clone GK1.5, #100403), anti-CD8 (clone 53-6.7, #100703), anti-Gr1 (clone RB6-8C5, #108403), anti-Mac1 (clone M1/70, #101203) and APC-Cy7 anti-c-kit (clone 2B8, #105825), PE-Cy7 anti-sca-1 (clone D7, #108113), APC anti-CD150 (clone TC15-12F12.2, #115909) and PE anti-CD41 (clone MWReg30, #133905) (Biologend) for 30 min. After staining, cells were washed with FACS staining medium, pelleted down by centrifugation (1200 rpm, 5 min) and stained with streptavidin Pacific-Blue Conjugate (#1094418, Invitrogen) for 30 min followed by second wash with FACS staining medium. The cells were then pelleted down by centrifugation (1200 rpm, 5 min), resuspended in FACS staining medium containing SYTOX blue dead cell stain (S34857, Life Technologies) and acquired on LSRFortessa™ (BD Biosciences) (FACS gating strategy, Supplementary Fig. 9a).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from peripheral blood or cord blood were collected in EDTA tubes and isolated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation. PBMCs were immuno-stained with anti-CD34-PE-Cy7 and anti-CD45-APC antibodies in stain Buffer (BD Biosciences) for 45 min and washed. The cells were fixed and permeabilized in commercial solution (BD Biosciences) and then stained using anti-HSP FITC/Alexa 488 or anti-mouse IgG FITC control antibody for 30 min. After washing, the cells were analysed by flow cytometry. The CD45^{low}/CD34^{high} population was gated and the median fluorescence intensities of intracellular HSPs were evaluated (FACS gating strategy, Supplementary Fig. 9b).

Purification of CD34+ cells and erythroid progenitor assays. Mononuclear cells from MPN patients were obtained over a Ficoll density gradient and CD34+ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS, Miltenyi Biotec). CD34+ cells were cultured 2 days in a liquid culture system stimulating erythropoiesis, in the presence of 50 ng ml⁻¹ recombinant human stem cell factor (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), 50 U ml⁻¹ interleukin-3 (Novartis, Basel, Switzerland) and 3 U ml⁻¹ erythropoietin (EPO; Orthobiotec, Paris, France). Cells were then transduced with lentiviral vector encoding shRNA-HSP27 or control vector (CTL). The CD34+/GFP+ were sorted 24 h later and 750–1000 cells were plated in duplicate in semi-solid conditions (methylcellulose) (H4230, Stem Cell Technologies) supplemented with interleukin-3, stem cell factor and EPO. BFU-E colonies were counted 14 days later and were plucked from methylcellulose for genotyping. The JAK2V617F mutational status was analysed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), using fluorescent competitive probes.

Immunoassays. Blood samples were centrifuged at 20 °C for 15 min at 2500 × g, and serum aliquots were stored at -80 °C for subsequent analysis. Since some HSPs are known to be unstable in plasma, we used serum for the analysis⁷⁵. Serum levels of HSP70, HSP90α and HSP27 in patients and serum level of HSP27 in mice were quantified using specific enzyme-linked (ELISA) kits according to the manufacturer's protocol (human HSPs: ADI-EKS-715, ADI-EKS-895 ADI-EKS-500, (Enzo Life Sciences); mouse HSP27: SEA693Mu, (Cloud Clone Corp)). Before quantification, sera were diluted at 1:50 for HSP90, 1:4 for HSP70 and 1:10 dilution for HSP27 or 1:2 to detect mouse HSP27.

Immunohistochemistry. Immunohistochemistry of patient biopsies was performed using an automated Leica Bond Max on formalin-fixed, paraffin-embedded spleen sections (5 µm). Sections were deparaffinized and rehydrated through a graded series of xylene-ethanol baths. Antigen retrieval was performed using Citrate Buffer pH 6.0 for 20 min at 95 °C. Tissue sections were incubated with primary antibody for 1 h at room temperature. The antibodies were used in a 1:100 dilution for anti-HSP27 (clone G3.1, SPA-800); 1:500 dilution for anti-HSP70 (clone

C92F3A-5, ab47455); and 1:500 dilution for anti-HSP90 (clone D7a, ab59459). Visualization was performed using Novolink™ Polymer Detection Systems (Leica Biosystems). Tissue sections were counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted. Analysis was performed in a blinded fashion. Images were organized in folders identified by patient ID by one person and quantified by another.

Statistics. Data are displayed as means \pm s.e.m. or \pm s.d. Statistically significant differences between two groups was assessed using the unpaired *t* test with Welch's correction (for CD34⁺ HPCs from patients), the Mann–Whitney test or Student's *t* test depending on the distribution of the tested population. Similarity of variance was tested using GraphPad PRISM (San Diego, CA, USA) before the application of any statistical test. *P* values less than 0.05 were considered significant.

Data availability. The authors declare that the other data supporting the findings of this study are available within the paper (and its supplementary information files).

Received: 10 February 2017 Accepted: 27 February 2018

Published online: 12 April 2018

References

- Kampinga, H. H. et al. Guidelines for the nomenclature of the human heat shock proteins. *Cell Stress Chaperons* **14**, 105–111 (2009).
- Garrido, C., Brunet, M., Didelot, C., Schmitt, E. & Kroemer, G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* **5**, 2592–2601 (2006).
- Lanneau, D. et al. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J. Cell Mol. Med.* **12**, 743–761 (2008).
- Dokladny, K., Myers, O. B. & Moseley, P. L. Heat shock response and autophagy. *Autophagy* **11**, 200–213 (2015).
- Jego, G., Hazoume, A., Seigneuric, R. & Garrido, C. Targeting heat shock proteins in cancer. *Cancer Lett.* **332**, 275–285 (2013).
- Hajare, M., François, G., Fontenay, M. & Garrido, C. Heat shock proteins in hematopoietic malignancies. *Exp. Cell Res.* **318**, 1946–1958 (2012).
- Acunzo, J., Andrieu, C., Baylot, V., So, A. & Rocchi, P. Hsp27 as a therapeutic target in cancers. *Curr. Drug Targets* **15**, 423–431 (2014).
- Vidyasagar, A., Wilson, N. & Djamali, A. Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenes Tissue Repair* **5**, 7 (2012).
- Straume, O. et al. Suppression of heat shock protein 27 induces long-term dormancy in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 8699–8704 (2012).
- Zhang, S. A. I. et al. Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer. *Oncol. Lett.* **9**, 2572–2576 (2015).
- Feng, J., Liu, Y., Song, H., Dai, Z. & Qin, L. Heat-shock protein 27: a potential biomarker for hepatocellular carcinoma identified by serum proteome. *Proteomics* **5**, 4581–4588 (2005).
- Banerjee, S. et al. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res.* **71**, 318–327 (2011).
- Wettstein, G. et al. Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J.* **27**, 1549–1560 (2013).
- Kamada, M., So, A., Muramaki, M., Kamada, M. & So, A. Hsp27 knockdown using nucleotide-based therapies inhibit tumor growth and enhance chemotherapy in human bladder cancer cells inhibit tumor growth and enhance chemotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 299–308 (2007).
- Baylot, V. et al. OGX-427 inhibits tumor progression and enhances gemcitabine chemotherapy in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* **2**, e221 (2011).
- Vidyasagar, A., Reese, S., Acun, Z., Hullett, D. & Djamali, A. HSP27 is involved in the pathogenesis of kidney tubulointerstitial fibrosis. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* **295**, 707–716 (2008).
- Kuter, D. J., Bain, B., Mufti, G., Bagg, A. & Hasserjian, R. P. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br. J. Haematol.* **139**, 351–362 (2007).
- Ghanima, W. et al. Bone marrow fibrosis in 66 patients with immune thrombocytopenia treated with thrombopoietin-receptor agonists: a single-center, long-term follow-up. *Haematologica* **99**, 937–944 (2014).
- Mascarenhas, J., Roper, N., Chaurasia, P. & Hoffman, R. Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies. *Clin. Epigenetics* **2**, 197–212 (2011).
- Cross, N. C. P. Genetic and epigenetic complexity in myeloproliferative neoplasms. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* **2011**, 208–214 (2011).
- Tefferi, A. et al. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1356–1363 (2011).
- Villevall, J. et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood* **90**, 4369–4383 (1997).
- Tiedt, R. et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* **111**, 3931–3940 (2008).
- Varricchio, L., Migliaccio, A. R. & Mancini, A. Pathological interactions between hematopoietic stem cells and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis. *Expert Rev. Hematol.* **2**, 315–334 (2010).
- Debeurme, F. et al. JAK2 inhibition has different therapeutic effects according to myeloproliferative neoplasm development in mice. *J. Cell Mol. Med.* **19**, 2564–2574 (2015).
- Kubovcakova, L. et al. Differential effects of hydroxyurea and INC424 on mutant allele burden and myeloproliferative phenotype in a JAK2-V617F polycythemia vera mouse model. *Blood* **121**, 1188–1199 (2013).
- Chen, Y. et al. Identification of Shp-2 as a Stat5A phosphatase. *J. Biol. Chem.* **278**, 16520–16527 (2003).
- Chen, J., Yu, W.-M., Bunting, K. D. & Qu, C.-K. A negative role of SHP-2 tyrosine phosphatase in growth factor-dependent hematopoietic cell survival. *Oncogene* **23**, 3659–3669 (2004).
- Yu, B. et al. Targeting protein tyrosine phosphatase shp2 for the treatment of PTPN11-associated malignancies. *Mol. Cancer Ther.* **12**, 1738–1748 (2013).
- Gautier, E. et al. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2 V617F oncogene. *Blood* **119**, 1190–1190 (2012).
- Fu, L. & Liang, J. J. Detection of protein-protein interactions among lens crystallins in a mammalian two-hybrid system assay. *J. Biol. Chem.* **277**, 4255–4260 (2002).
- Cordonnier, T. et al. Hsp27 regulates EGF/beta-catenin mediated epithelial to mesenchymal transition in prostate cancer. *Int. J. Cancer* **136**, E496–E507 (2015).
- Wu, R. et al. Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex. *J. Biol. Chem.* **282**, 21598–21608 (2007).
- Shi, Y., Nishida, K., Campigli, D., Giammartino, D. & Manley, J. L. Heat shock-induced SRSF10 dephosphorylation displays thermotolerance mediated by Hsp27. *Mol. Cell Biol.* **31**, 458–465 (2011).
- Jiang, Y. et al. Expression of heat shock protein 27 in benign prostatic hyperplasia with chronic inflammation. *Med. Sci. Monit.* **21**, 2976–2985 (2015).
- Jin, C. et al. Human myocardium releases heat shock protein 27 (HSP27) after global ischemia: the proinflammatory effect of extracellular HSP27 through Toll-like receptor (TLR) -2 and TLR4. *Mol. Med.* **20**, 280–289 (2014).
- Hasselbalch, H. C. Chronic inflammation as a promoter of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk. Res.* **37**, 214–220 (2013).
- Sevin, M., Girodon, F., Garrido, C. & de Thonel, A. HSP90 and HSP70: implication in inflammation processes and therapeutic approaches for myeloproliferative neoplasms. *Mediators Inflamm.* **2015**, 970242 (2015).
- Fiskus, W. et al. Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells. *Clin. Cancer Res.* **17**, 7347–7358 (2011).
- Marubayashi, S. et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 3578–3593 (2010).
- Choi, S. et al. HSPB1 inhibits the endothelial-to-mesenchymal transition to suppress pulmonary fibrosis and lung tumorigenesis. *Cancer Res.* **76**, 1019–1030 (2016).
- Desterke, C. et al. FLT3-mediated p38–MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis. *Cancer Res.* **71**, 2901–2915 (2011).
- Kroger, N. & Toni Giorgio, B. L. S. Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. *Blood* **125**, 3347–3351 (2015).
- Emanuel, R. M. et al. Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *J. Clin. Oncol.* **30**, 4098–4103 (2012).
- Tremblay, D., Marcellino, B. & Mascarenhas, J. Pharmacotherapy of myelofibrosis. *Drugs* **77**, 1549–1563 (2017).
- Wu, J. et al. Heat shock proteins and cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **38**, 226–256 (2017).
- Sidera, K. & Patsavoudi, E. HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov.* **9**, 1–20 (2014).

48. Ambati, S. R. et al. Pre-clinical efficacy of PU-H71, a novel HSP90 inhibitor, alone and in combination with bortezomib in Ewing sarcoma. *Mol. Oncol.* **8**, 323–336 (2014).
49. Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F. & Voellmy, R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* **94**, 471–480 (1998).
50. Cerchietti, L. C. et al. A purine scaffold Hsp90 inhibitor destabilizes BCL-6 and has specific antitumor activity in BCL-6-dependent B cell lymphomas. *Nat. Med.* **15**, 1369–1376 (2009).
51. Harrison, C. N. et al. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol.* **4**, e317–e324 (2017).
52. Pardanani, A. et al. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **29**, 789–796 (2011).
53. Thuringer, D. et al. Extracellular HSP27 mediates angiogenesis through Toll-like receptor 3. *FASEB J.* **27**, 4169–4183 (2013).
54. Korfei, M. et al. Comparative proteomic analysis of lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and lung transplant donor lungs. *J. Proteome Res.* **10**, 2185–2205 (2011).
55. Jeremy Wen, Q. et al. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat. Med.* **21**, 1473–1480 (2015).
56. Liu, T., Zhou, Y., KoK, S. & Yang, H. Interactions between Myc and mediators of inflammation in chronic liver diseases. *Mediators Inflamm.* **2015**, 276850 (2015).
57. Collum, R. G., Brutsaert, S., Lee, G. & Schindler, C. A Stat3-interacting protein (StIP1) regulates cytokine signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10120–10125 (2000).
58. Kageyama, Y. et al. Rac regulates collagen-induced HSP27 phosphorylation via p44/p42 MAP kinase in human platelets. *Int. J. Mol. Med.* **32**, 813–818 (2013).
59. Bock, O., Loch, G., Büsche, G., von Wasielewski, R. & Schlué, J., K. H. Aberrant expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptor- α is associated with advanced bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis. *Hematologica* **90**, 8–9 (2005).
60. Eustace, B. K. et al. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat. Cell Biol.* **6**, 507–514 (2004).
61. Tsutsumi, S. et al. A small molecule cell-impermeant Hsp90 antagonist inhibits tumor cell motility and invasion. *Oncogene* **27**, 2478–2487 (2008).
62. García, R. et al. Extracellular heat shock protein 90 binding to TGF β receptor I participates in TGF β -mediated collagen production in myocardial fibroblasts. *Cell. Signal.* **28**, 1563–1579 (2016).
63. Saini, J. & Sharma, P. Clinical, prognostic and therapeutic significance of heat shock proteins in cancer. *Curr. Drug Targets* **18**, <https://doi.org/10.2174/1389450118666170823121248> (2017).
64. Melle, C. et al. Protein profiling of microdissected pancreas carcinoma and identification of HSP27 as a potential serum marker. *Clin. Chem.* **53**, 629–635 (2007).
65. Liao, W.-C., Wu, M.-S., Wang, H.-P., Tien, Y.-W. & Lin, J.-T. Serum heat shock protein 27 is increased in chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Pancreas* **38**, 422–426 (2009).
66. Fanelli, M. A., Cuello Carrión, F. D., Dekker, J., Schoemaker, J. & Ciocca, D. R. Serological detection of heat shock protein hsp27 in normal and breast cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **7**, 791–5 (1998).
67. Stope, M. B. et al. Heat shock protein HSP27 secretion by ovarian cancer cells is linked to intracellular expression levels, occurs independently of the endoplasmic reticulum pathway and HSP27's phosphorylation status, and is mediated by exosome liberation. *Dis. Markers* **2017**, 1575374 (2017).
68. Zembron-Lacny, A., Ziemann, E., Zurek, P. & Hübner-Wozniak, E. Heat shock protein 27 response to wrestling training in relation to the muscle damage and inflammation. *J. Strength Cond. Res.* **31**, 1221–1228 (2017).
69. Thuringer, D. et al. Primary tumor- and metastasis-derived colon cancer cells differentially modulate connexin expression and function in human capillary endothelial cells. *Oncotarget* **6**, 28800–28815 (2015).
70. Banerjee, S. et al. Heat shock protein 27 differentiates tolerogenic macrophages that may support human breast cancer progression. *Cancer Res.* **71**, 318–327 (2011).
71. Tokuda, H. et al. Thrombin receptor-activating protein (TRAP)-activated AKT is involved in the release of phosphorylated-HSP27 (HSPB1) from platelets in DM patients. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, pii: E737 (2016).
72. Britschgi, A. et al. JAK2/STAT5 inhibition circumvents resistance to PI3K/mTOR blockade: a rationale for cotargeting these pathways in metastatic breast cancer. *Cancer Cell* **22**, 796–811 (2012).
73. Vainchenker, W. & Constantinescu, S. N. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene* **32**, 2601–2613 (2013).
74. Duval, R. et al. An acetyltransferase assay for CREB-binding protein based on reverse phase-ultra-fast liquid chromatography of fluorescent histone H3 peptides. *Anal. Biochem.* **486**, 35–37 (2015).
75. Zimmermann, M. et al. In vitro stability of heat shock protein 27 in serum and plasma under different pre-analytical conditions: implications for large-scale clinical studies. *Ann. Lab. Med.* **36**, 353 (2016).

Acknowledgements

The authors thank the patients and healthy donors for participating and donating samples to make this research possible. The authors thank the Cellimap platform for immunohistochemistry, Dr. Kevin Cheesman and Mr. Philip Bastable (University Hospital, Dijon, France) for revising the manuscript and Dr Vincent Ribrag for patients' serum samples. This work was funded by "La Ligue contre le cancer", the "Association pour la Recherche sur le Cancer", the association "Laurette Fugain" and the GR-Ex 2014 and the association "Tulipes contre le cancer".

Author contributions

M.S. designed the majority of experiments, performed the research and analysed data; N.P., M.C. and G.C. performed BLI experiments, ELISA and immunoblotting; S.C. designed the PLA study; L.K., J.L.V. and C.L. generated the mouse models; F.V. analysed the mouse immunohistochemistry studies; I.P. and M.M. performed the erythroid progenitor assay. F.R.-L. gave us the domain of CBP, M.G. gave the drug (OGX-427); M.L.C., J.N.B., S.A., P.S., S.R., L.M. and I.P. collected patient samples; A.d.T., F.G. and C.G. directed the work, supervised the experiments and wrote the paper; I.P., R.S. and V.M. belong to the advisory PhD committee and revised the manuscript. All authors have seen and approved the final version of the manuscript before submission.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03627-9>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Titre : Caractérisation du mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs

Mots clés : hématologie – néoplasmes myéloprolifératifs – IFN – JAK2 – CALR

Résumé : Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques sont des hémopathies malignes dues à des anomalies génétiques acquises au niveau des CSH. Parmi ces pathologies, on retrouve la Thrombocytémie Essentielle (TE), la Polyglobulie de Vaquez (PV) et la Myélofibrose Primaire (MFP). Les mutations responsables de ces maladies sont JAK2^{V617F}, des mutations de la Calréticuline (CALR) et de MPL (le récepteur à la thrombopoïétine) et activent toutes la voie de signalisation du récepteur de cytokine/JAK2/STAT. Il existe différents traitements symptomatiques de ces maladies mais l'interféron alpha (IFN α) est l'un des seuls traitements curatifs qui induit à la fois une réponse hématologique et moléculaire. L'objectif principal de ce travail consiste en l'étude et la caractérisation du mécanisme d'action de l'IFN α grâce à : i) une cohorte de patients traitée en clinique, ii) un modèle de souris knock-in JAK2^{V617F}, iii) des modèles de lignées cellulaires de souris et iv) des cellules primaires de patients traitées *in vitro*. Les effets de l'IFN α *in vivo* chez l'Homme sur différents compartiments hématopoïétiques d'une cohorte de patients atteints de TE/PV/MFP et portant les 3 mutations motrices ont été étudiés. Ainsi, les résultats dévoilent plusieurs ciblages préférentiels :

des cellules progénitrices et souches (CPSH) JAK2^{V617F} plutôt que des CPSH CALR^{mut}, des CPSH JAK2^{V617F} plutôt que des cellules matures JAK2^{V617F} ainsi que les clones homozygotes JAK2^{V617F} plutôt que ceux hétérozygotes. La réponse à l'IFN α semble donc être liée à la présence de JAK2^{V617F} contrairement à CALR^{mut}. Sur les lignées murines Ba/F3-MPL JAK2^{WT/V617F}, les résultats montrent que JAK2^{V617F} améliore la sensibilité à l'IFN α en augmentant à la fois l'expression et la phosphorylation de STAT1 ainsi que l'expression de gènes cibles (ISGs) de l'IFN α . Sa combinaison avec des inhibiteurs de JAKs dans les modèles *in vitro* et *in vivo* chez la souris suggère une inhibition complète de la voie de l'IFN α par le ruxolitinib (inhibiteur de JAK1/2) mais une potentialisation de la voie de l'IFN α et de son effet thérapeutique par le BMS911543 (inhibiteur de JAK2). Au final, ce travail montre une sensibilité particulière des patients JAK2^{V617F} à l'IFN α en clinique et propose des combinaisons possibles de traitements capables d'optimiser la réponse grâce à la compréhension de son mécanisme d'action. Ce travail donne également des pistes explicatives quant aux résistances induites par ce traitement (mutations associées et fond génétique).

Title : Deciphering the mechanism of action of interferon alpha in myeloproliferative neoplasms

Keywords : hematology – myeloproliferative neoplasm – IFN – JAK2 – CALR

Abstract : Classical myeloproliferative neoplasms are hematological malignancies due to genetic abnormalities acquired in HSC. These diseases include Essential Thrombocytemia (ET), Polycythemia Vera (PV) and Primary Myelofibrosis (PMF). The main abnormalities are JAK2^{V617F}, Calreticulin (CALR) and MPL (TPO receptor) mutations and result in an activation of the cytokine receptor/JAK2/STAT-signaling pathway. There are several symptomatic treatments for these diseases but interferon alpha (IFN α) is one of the only curative drugs that lead both to hematological and molecular response. The main aim of this study is to decipher the mechanism of action of IFN α using i) an *in vivo* IFN α treated JAK2^{V617F} and CALR^{mut} patients cohort, ii) a knock-in JAK2^{V617F} mouse model, iii) murine JAK2^{V617F} and CALR^{mut} cell lines and iv) *in vitro* IFN α treated patients primary cells. The effects of *in vivo* IFN α in several hematopoietic compartments using a cohort of ET/PV/PMF patients harboring the 3 drivers mutations have been studied. The results show several preferential targeting: JAK2^{V617F} stem and progenitor cells

(HSPC) rather than CALR^{mut} HSPC, JAK2^{V617F} HSPC rather than JAK2^{V617F} mature cells and JAK2^{V617F} homozygous clones rather than heterozygous ones. Therefore, JAK2^{V617F} seems to be linked to IFN α response, in contrast to CALR^{mut}. On Ba/F3-MPL JAK2^{WT/V617F} cell lines, results show that JAK2^{V617F} greatly sensitizes to IFN α treatment on both STAT1 expression and phosphorylation as well as on ISGs expression. JAK inhibitors and IFN α combination treatments on *in vitro* and *in vivo* murine models induces a complete inhibition of IFN α -signaling pathway in the presence of ruxolitinib (JAK1/2 inhibitor) and synergize this signaling and the IFN α therapeutic effect with BMS911543 (JAK2 inhibitor). Altogether, these results show that JAK2^{V617F} patients are very sensitive to IFN α and allow the improvement of IFN α therapy through combination of treatments thanks to the understanding of its mechanism of action. This works also suggests some mechanisms of resistance to IFN α treatment (associated mutations and genetic background).

