Rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F et des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myéloprolifératives

Alexandre Guy

▶ **To cite this version:**

Alexandre Guy. Rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F et des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myéloprolifératives. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0226 . tel-03017574

HAL Id: tel-03017574
https://theses.hal.science/tel-03017574

Submitted on 21 Nov 2020

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.

université de BORDEAUX

Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé

Spécialité Biologie cellulaire et Physiopathologie

Thèse présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Soutenue publiquement le 20 Novembre 2018

par

Alexandre Guy,

né le 14 Février 1988 à Clermont-Ferrand

Rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F et des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myéloprolifératives

Sous la direction du Professeur Chloé JAMES

Jury :

Professeur Nadine Ajzenberg, *Université Paris-Diderot*	**Présidente, rapportrice**
Professeur Christophe Dubois, *Université Aix-Marseille*	**Rapporteur**
Professeur Patrick Blanco, *Université de Bordeaux*	**Examinateur**
Professeur Valérie Ugo, *Université d'Angers*	**Examinateur**
Professeur Jean-François Viallard, *Université de Bordeaux*	**Membre invité**
Professeur Chloé James, *Université de Bordeaux*	**Directrice de thèse**

Titre : Rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F et des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myéloprolifératives

Résumé : Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des maladies hématologiques acquises de la cellule souche hématopoiétique (CSH) caractérisées par une prolifération accrue de cellules sanguines. Une mutation activatrice de la protéine JAK2 (JAK2V617F) a été identifiée chez plus de 50% des patients. La survenue de thromboses au niveau artériel et veineux constitue une des principales complications au cours de ces maladies. Au cours d'un premier axe de travail, nous avons souhaité étudier les conséquences sur la physiopathologie de la thrombose de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales (CE). Utilisant deux approches complémentaires, *in vitro* avec l'utilisation de cellules endothéliales veineuses, et *in vivo* avec l'utilisation d'un modèle murin permettant la présence de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial, nous avons démontré que la présence de CE JAKV617F favorisait la survenue de thrombose. Cette augmentation de la survenue de thrombose était médiée par une augmentation de l'adhésion des leucocytes au niveau des CE JAK2V617F, secondaire à une augmentation d'expression de P-Sélectine à leur surface. Ce travail a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP JAK2V617F. Au cours d'un second axe de travail, nous avons étudié les polynucléaires neutrophiles (PNN) et le phénomène de NETose (formation de neutrophil extracellular traps ou NET) au cours des NMP. Nous avons démontré que la formation de NET était augmentée dans une cohorte de patients avec NMP, tout comme des marqueurs indirects de NETose (ADN plasmatique, MPO-ADN plasmatique). Nous avons mis en évidence que les taux de MPO-ADN plasmatique étaient plus élevés chez les patients avec antécédents de thrombose par rapport aux patients sans. Nous avons confirmé ces résultats à l'aide de deux modèles murins différents dans lesquels nous avons également retrouvé une formation de NET augmentée. Nous avons mis en évidence que cette formation de NET participait à la physiopathologie de la thrombose, l'administration de DNAse entraînant une réduction de la survenue de thrombose. Enfin, nous avons démontré que les plaquettes JAK2V617F stimulaient la production de NET par les PNN JAK2V617F, suggérant une collaboration de ces deux types cellulaires au cours de la physiopathologie de la thrombose des NMP.

Mots clés : Néoplasies myéloprolifératives, Cellules endothéliales, Polynucléaires neutrophiles, Thrombose, NET, mutation JAK2V617F.

Title: Implication of JAK2V617F endothelial cells and neutrophils in the physiopathology of thrombosis during myeloproliferative neoplasms

Summary: Myeloproliferative neoplasms (MPN) are acquired hematologic diseases of the hematopoietic stem cell (HSC) characterized by blood cell proliferation. An activating mutation of the protein JAK2 (JAK2V617F) has been identified in more than 50% of patients. The occurrence of arterial and venous thrombosis is one of the main complications during these diseases. We first studied the consequences of the presence of the JAK2V617F mutation in endothelial cells (EC) on the physiopathology of thrombosis. We used two complementary approaches, in vitro with the use of human venous endothelial cells, and in vivo with the use of a mouse model allowing the presence of the JAK2V617F mutation only in the endothelial compartment: the *PDGFb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ model. We first observed that *PDGFb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice displayed a higher propensity for thrombosis. This increased thrombus formation was mediated by an increased leukocyte adhesion in presence of JAK2V617F EC, secondary to an increase in P-Selectin expression at their surface. This work made it possible to highlight a new mechanism of the physiopathology of thrombosis during JAK2V617F MPN. Then we studied neutrophils and the phenomenon of NETosis (formation of neutrophil extracellular traps or NET) during MPN. We demonstrated that NET formation was increased in a cohort of patients with MPN, such as indirect markers of NETosis (plasmatic DNA and MPO-DNA). We found that plasma MPO-DNA levels were higher in patients with a history of thrombosis compared to patients without. We confirmed these results using two different mouse models in which we also found increased NET formation. We found that NET formation was involved in the physiopathology of thrombosis, as DNAse administration resulted in a reduction of thrombosis occurrence. Finally, we demonstrated that JAK2V617F platelets stimulated NET formation by JAK2V617F neutrophils, suggesting collaboration of these two cell types during the physiopathology of thrombosis during MPN.

Key words: Myeloproliferative neoplasms, endothelial cells, neutrophils, thrombosis, NET, JAK2V617F mutation

Remerciements

Au Professeur Chloé James,

Merci de m'avoir accueilli dans ton équipe et de m'avoir fait confiance. Je tiens de toi tout ce que je connais de la recherche. J'ai pu bénéficier de ta vision exigeante, rigoureuse, et « absolue » de faire de ce métier ; et c'est un cadeau précieux. Merci pour ta disponibilité constante, pour ton énergie dépensée tout au long de cette thèse. Merci d'avoir organisé les choses de façon que cette dernière année de thèse se déroule au mieux. Enfin, merci pour ton écoute, tes conseils, ta bienveillance. J'espère de tout cœur que cette thèse n'est que le début et que nous pourrons travailler longtemps ensemble.

Au Professeur Nadine Ajzenberg,

Merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté d'en être l'une des rapporteurs.

Au Professeur Valérie Ugo, au Professeur Patrick Blanco,

Merci de me faire l'honneur de juger mon travail au regard de vos expertises respectives. Je vous remercie de votre présence aujourd'hui.

Au Professeur Christophe Dubois,

Merci de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse et d'avoir accepté d'en être un des rapporteurs.

Au Professeur Jean-François Viallard,

Merci d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'être présent aujourd'hui. Merci surtout pour vos conseils, votre aide et votre écoute depuis le début de mon internat. Vous avez accompagné mes doutes et changements de cap avec franchise et bienveillance, je vous en remercie beaucoup. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble et à collaborer sur de beaux projets.

Au Professeur Thierry Couffinhal,

Merci de m'avoir accueilli dans votre unité. Surtout, merci pour vos conseils, votre écoute et votre aide tout au long de ce travail de thèse. Il y a trois ans, vous avez contribué à ce que je me lance dans ce travail, je vous ai écouté et ne le regrette pas.

A toute l'équipe de l'Unité Inserm 1034,

Un très grand merci à tous pour votre accueil, votre aide précieuse durant ces trois années, et toutes les discussions scientifiques qui m'ont aidé dans ce travail.

A l'équipe de Chloé James,

A **Virginie,** en premier bien sûr. Je n'aurais jamais pu faire ce travail sans toi. J'ai le sentiment que nous avons travaillé « main dans la main » tout au long de cette thèse et j'en suis extrêmement heureux. Merci pour le travail gigantesque que tu accomplis tous les jours, pour tout ce que tu as apporté à ce travail, toutes les compétences que tu nous as fourni, pour ton apprentissage permanent de nouvelles techniques, pour ta curiosité et ta capacité d'adaptation. Tu m'as déchargé d'un nombre incroyable de choses et su pallier bon nombre de mes carences (notamment organisationnelles…). J'ai conscience d'avoir eu énormément de chance que tu sois là dans l'équipe. Merci enfin pour ta bonne humeur permanente, et pour toutes nos discussions, notamment littéraires.
Merci à tous les membres actuels de l'équipe. A **Olivier Mansier**, c'est un plaisir de pouvoir travailler à tes côtés. A **Sylvie Colomer** pour ton aide, nos discussions et ton apport dans ce travail. Merci à tous les étudiants qui ont participé à ce travail, et notamment un grand merci à **Simon Favre** pour ton important travail sur les NET cette année, c'était un plaisir de travailler avec toi. Merci également à **Laure Deloison** pour tout le travail d'initiation que tu as effectué sur le projet « NET ». A **Philippe Alzieu** pour ton aide et tes compétences. Merci à tous les étudiants qui ont participé à ce travail, ces « travailleurs de l'ombre », notamment **Clémence**, **Adelaïde, Nadhir, Léa, Nina, Marianne, Adé, Simon, Yohann**. Merci à **Badr Kilani**, pour le travail que tu as effectué avant mon arrivée, et qui m'a permis de réaliser celui-ci.

A tous les chercheurs qui ont collaboré à ce travail,

Merci à tous les gens qui nous ont aidé dans ce travail, notamment un grand merci à **Martine Jandrot-Perrus** et **Yacine Boulaftali** pour vos conseils et votre aide, à **Jean-Luc Villeval** et **Mathieu Mosca**, à **Caroline Marty** et **William Vainchenker**, à **Pierre-Emmanuel Rautou** et **Johanne Poisson**.

A tous les cliniciens qui ont participé à ce travail,

Un grand merci à tous les médecins qui nous ont aidé dans ce travail, afin de constituer notre base de données. Merci à tous les médecins des services de médecine interne et en particulier au **Professeur Estibaliz Lazaro**, au **Docteur Etienne Rivière**, au **Docteur Irène Machelard**, au **Professeur Pierre Duffau**, au **Docteur Emmanuel Ribeiro**, au **Docteur Anne Contis**. Merci également au **Docteur Sophie Skopinski** et au **Docteur Gabriel Etienne**. Merci aux médecins du service d'hématologie clinique et en particulier au **Docteur Axelle Lascaux**, au **Docteur Edouard Forcade**, au **Docteur Claire Calmettes**. Merci au **Docteur Gaëlle Laboure**.

A l'équipe du Laboratoire d'Hématologie,

Merci pour ces douze mois passés en votre compagnie. Merci en particulier à tous les « hémostasiens », au **Docteur Christine Mouton**, au **Docteur Céline Delassasseigne**, au **Docteur Mathieu Fiore** et au **Docteur Anne Ryman**, de m'avoir accueilli, de m'avoir initié à cette belle spécialité, et de m'avoir permis de terminer cette thèse dans des conditions idéales. Il me reste énormément de choses à apprendre et j'espère que je pourrai le faire à vos côtés.

Au Professeur Olivier Aumaître,

Merci beaucoup pour votre amitié et votre soutien précieux.

A ma famille,

A mon père, ma mère, à Martine et Alain, quelques mots ne suffisent pas, mais je vous remercie pour votre amour et votre soutien inconditionnels. Votre regard, toujours bienveillant, votre confiance en moi et votre présence constantes m'ont permis d'arriver ici aujourd'hui. A **Bastien**, toi dont la présence m'est indispensable, je profite de ces quelques mots pour te redire mon amour et ma fierté. A **Eliana**, pour ta présence bienveillante et ta bonne humeur. A **« Mamie Françoise »**, pour ton amour, ta confiance en nous, de nous avoir tant « gâtés ». A **Barbara, Yann, Margot et Julia**, pour votre soutien et votre amour. A **Laurent et Christiane**, pour votre présence et votre affection. A **David et Joëlle**, pour votre accueil au pied levé à chacun de mes déplacements parisiens, dans votre chez-vous et sur votre (confortable) canapé-lit.
En somme, j'ai de la chance d'avoir grandi, et de continuer à grandir, dans une famille comme la nôtre.

A mes amis,

A mes « vieux » amis, **Célian**, **Clément**, **Lisa**, **Romain**, **Anne-Sophie**, **Marie**, **Clément**, **Thibaut**, **Marine**, **Mehdi**, pour votre amitié qui m'est précieuse. Mes pensées sont bien souvent tournées vers vous. A **Albane**, **Louis**, **Amandine**, **Vincent**, **Thomas**, **Elisa**, **Marion**, **Benoit**, **François**, **Olivier**, **Rabia**, **Arnaud, Manon**, **Florian, Clémentine**, **Julien** pour votre amitié, votre présence, et vos conseils de tous les instants. Je suis heureux de tous ces moments passés ensemble. A **Charles**, merci pour ton amitié, nos discussions et tes conseils.

A Murielle,

Que ferais-je sans toi ?
Merci pour tout, merci pour ce que tu m'apportes, pour ton amour, ton intelligence, ta façon de voir la vie, merci de rajouter une dimension à mon monde.
Je n'aurais pas pu réaliser ce travail sans toi,
Tu m'as soutenu, conseillé, rassuré, supporté, et j'ai bien conscience que cela n'a pas été facile tous les jours.
Je ferai tout pour que nous soyons le plus heureux possible.

A Juliette,

On se connaît depuis peu mais, si un jour tu lis ce manuscrit (j'espère que tu liras des choses plus intéressantes), tu sauras que tes premiers cris ont bercé sa rédaction, et que tu me rends le plus heureux des hommes.

Sommaire

Pages

INTRODUCTION 22

1ère partie : Les néoplasies myéloprolifératives 22

I. Généralités sur l'hématopoïèse et les cellules souches hématopoiétiques 22

II. Classification et caractéristiques cliniques des néoplasies myéloprolifératives 25

A. La thrombocytémie essentielle (TE) 28

B. La Polyglobulie de Vaquez (PV) 29

C. La myélofibrose primitive (MFP) 31

III. Anomalies biologiques et moléculaires des NMP non-LMC (ou BCR-ABL négatif) 34

A. La mutation JAK2V617F 34

a. La protéine JAK2 34

b. Les voies de signalisation en aval de JAK2 35

c. La mutation JAK2V617F 36

B. La mutation exon 12 de JAK2 38

C. La mutation du gène MPL codant pour le récepteur à la thrombopoïétine 39

D. La mutation du gène codant pour la calréticuline (CALR) 39

E. Les autres mutations retrouvées au cours des NMP BCR-ABL négatif 41

2ème partie : Les complications thrombotiques au cours des NMP BCR-ABL négatif 42

I. Aspects épidémiologiques 42

II. Rappels sur la physiopathologie de la thrombose 44

A. Rappels sur l'hémostase physiologique 44

a. Implication des plaquettes 45

b. Rôle de la cascade de la coagulation 46

c. Régulation des mécanismes d'hémostase 48

B. Rappel sur les mécanismes de thrombose artérielle et veineuse 48

a. Mécanismes de thrombose artérielle 48

b. Mécanismes de thrombose veineuse 52

III. Facteurs de risque et physiopathologie de la thrombose dans les NMP BCR-ABL négatif 55

A. Age et antécédent de thrombose 57

B. Rôle des cellules sanguines 57

a. Rôle des plaquettes 57

b. Rôle des leucocytes 62

c. Rôle des globules rouges 65

C. Rôle des cellules endothéliales 66

D. Rôle des facteurs plasmatiques 68

E. Rôle du statut mutationnel 69

F. Rôle des facteurs de risque cardio-vasculaires 71

Pages

IV. Stratification du risque de thrombose au cours des NMP BCR-ABL négatif ... *72*

A. Au cours de la TE ... *72*
B. Au cours de la PV ... *73*
C. Au cours de la MFP ... *73*

V. Prise en charge thérapeutique du risque thrombotique au cours de la TE et de la PV ... *74*

A. Place de l'aspirine ... *74*
a. Aspirine et syndrome de Willebrand acquis ... *76*
b. Une place pour l'aspirine à double dose au cours de la PV et de la TE ? ... *76*
B. Place des phlébotomies (ou saignées) au cours de la PV ... *77*
C. Place des anti-vitamine K (AVK) ... *77*
a. Dans les thromboses de tous territoires ... *77*
b. Dans les thromboses splanchniques ... *78*
D. Place des anticoagulants oraux directs (AOD) ... *79*
E. Les traitements cytoréducteurs ... *80*
a. Au cours de la PV ... *80*
b. Au cours de la TE ... *81*
F. Algorithmes de prise en charge des patients avec TE et PV ... *83*

3ème partie : Les cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F dans les NMP BCR-ABL négatif ... *86*

I. Vasculogénèse et hématopoïèse ... *86*

A. Chez l'embryon ... *86*
a. Vasculogénèse embryonnaire ... *86*
b. Hématopoïèse embryonnaire ... *87*
B. En post-natal et chez l'adulte ... *88*
a. Physiologie des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) ... *88*
b. Plusieurs types de progéniteurs endothéliaux circulants, avec des origines différentes ... *92*
c. Progéniteurs endothéliaux résidents ... *94*

II. Il existe des cellules endothéliales porteuses de la mutation JAK2V617F ... *96*

A. La recherche de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales au cours des NMP JAK2V617F ... *96*
a. Recherche de la mutation JAK2V167F dans des cellules endothéliales matures par technique de microdissection laser ... *96*
b. Recherche de la mutation JAK2V617F dans des progéniteurs endothéliaux circulants ... *97*
B. L'étude des conséquences de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales ... *100*

4ème partie : L'implication des polynucléaires neutrophiles (PNN) dans la physiopathologie de la thrombose des NMP JAK2V617F *102*

I. Rôle des leucocytes dans l'hémostase ... *102*

Pages

II. Les polynucléaires neutrophiles et la formation de neutrophil extracellular trap (NET) ... *103*

A. Les NET ... *103*

a. Mécanismes de formation ... *103*

b. Inducteurs de la formation de NET ... *105*

c. Mesure des NET : de quoi parle-t-on ? ... *106*

B. Implication des NET dans la thrombose ... *108*

a. Recrutement des leucocytes au site de la thrombose ... *108*

b. Mécanismes de promotion de la thrombose par les NET ... *111*

c. Participation des NET dans la thrombose veineuse profonde ... *112*

d. Participation des NET dans la thrombose artérielle ... *114*

e. Participation des NET au cours de la thrombose associée aux cancers ... *115*

C. Les NET comme cibles thérapeutiques au cours de la thrombose ... *117*

5ème partie : Hypothèses et objectifs du travail de thèse ... *122*

1ère hypothèse : **Les cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F participent à la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP JAK2V617F** ... *126*

2ème hypothèse : **Les polynuclaires neutrophiles et le phénomène de NETose participent à la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP JAK2V617F** ... *128*

RESULTATS ... *132*

Article 1 : **L'expression endothéliale de la mutation JAK2V617F induit un état pro-thrombotique secondaire à une augmentation d'expression de P-Sélectine** ... *134*

Article 2 : **Les biomarqueurs de NET comme des facteurs de risque de thrombose associée aux néoplasies myéloprolifératives** ... *184*

Article 3 : **Les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles collaborent pour induire une formation de neutrophil extracellular trap (NET) augmentée au cours des néoplasies myéloprolifératives avec mutation JAK2V617F** ... *208*

DISCUSSION et PERSPECTIVES ... *238*

1ère partie : Etude du rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myélo-prolifératives avec mutation JAK2V617F *238*

I. Principaux résultats obtenus ... *238*

Pages

II. Limites, questions soulevées et perspectives futures *239*

A. Comment la mutation JAK2V617F peut-t-elle survenir dans une cellule endothéliale ? *239*

a. L'hypothèse d'un hémangioblaste *241*

b. L'hypothèse d'un endothélium hémogénique *245*

c. L'hypothèse d'une différenciation d'une intégration monocytaire et/ou d'une différenciation hémato-endothéliale *247*

d. L'hypothèse du transfert génique *248*

B. L'ensemble de l'endothélium possède-t-il la mutation JAK2V617F ? *249*

C. Quel est le mécanisme responsable de l'augmentation de P-Sélectine retrouvée à la surface des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F ? *249*

D. Quelles seraient les éventuelles conséquences thérapeutiques de ce travail ? *252*

2ème partie : Etude du rôle des polynucléaires neutrophiles et du phénomène de NETose dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myélo-prolifératives avec mutation JAK2V617F *254*

I. Principaux résultats obtenus *254*

A. Au sein d'une cohorte de patients avec NMP *254*

B. A l'aide de modèles murins *255*

II. Limites, questions soulevées et perspectives futures *256*

A. Ces résultats sont-ils concordants avec les résultats d'études antérieures ? *256*

B. Quels sont les mécanismes responsables de l'augmentation de la formation de NET constatée au cours des NMP ? *259*

C. Le dosage de MPO-ADN plasmatique est-il un marqueur prometteur de thrombose au cours des NMP ? *261*

3ème partie : Un lien entre nos deux principaux axes de travail *264*

PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS *266*

REFERENCES *268*

Liste des abréviations

ADAMTS13	A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
AGM	Aorte-gonade-mésonéphros
AML1	Acute myeloid leukemia 1
ANCA	Anti neutrophil cytoplasm antibody
AOD	Anticoagulants oraux directs
ASXL1	Additional sex combs like 1
AVC	Accident vasculaire cérébral
AVK	Anti-vitamine K
BC-FC	Blast colony forming cell
BCL-2	B cell lymphoma 2
BET	Basophil extracellular traps
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
BOM	Biopsie ostéo-médullaire
CALR	Calréticuline
CBFß	Core-binding factor ß
CCP	Cyclic citrullinated peptides
CD	Cluster of differenciation
CEC	Cellules endothéliales circulantes
CFU-EC	Colony-forming unit endothelial cell
CIS	Cytokine induced SH2 protein
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CR	Cytoréducteur
CSH	Cellules souches hématopoiétiques
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR2	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
DNMT3A	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3A
ECFC	Endothelial colony forming cell
EET	Eosinophil extracellular traps
EFG	Epidermal growth factor
EGPA	Eosinophilic Granulomatosis with polyangiitis
EPCR	Endothelial protein C receptor
EPO	Erythropoietin
ERK	Extracellular signal-Related kinase
ET	Extracellular traps
EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
FGF	Fibroblast growth factor
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FLK1	Fetal liver kinase 1

FOS-B	Finkel-Biskis-Jinkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog B
FT	Facteur tissulaire
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GAB1	GRB2-associated-binding protein 1
GAS6	Growth-arrest specific protein 6
GfI1	Growth factor independent 1 transcriptional repressor
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
Gp	Glycoprotéine
GPA	Granulomatosis with polyangiitis
GR	Globules rouges
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GSK3	Glycogen synthase kinase 3
H3	Histone 3
HAEC	Human arterial endothelial cell
HMGB1	High–mobility group box 1
HR	Hazard ratio
HTA	Hypertension artérielle
HU	Hydroxyurée
HUVEC	Human venous endothelial cell
ICAM	Inter-cellular adhesion molecule
IDH1/2	Isocitrate déshydrogénase 1/2
IFN	Interféron
IGF	Insulin growth factor
IKZF1	IKAROS Family Zinc Finger 1
IL	Interleukin
IPSS	International Prognostic Scoring System
IRS2	Insulin receptor substrate 2
JAK2	Janus Kinase 2
JH	JAK homology
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinase
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire
LA	Leucémie aigue
LAP	Leucocyte alcaline phosphatase
LB	Lymphocyte B
LCE	Leucémie chronique à eosinophiles
LCN	Leucémie chronique à neutrophiles
LDG	Low-density granulocyte
LDH	Lactate déshydrogénase
LES	Lupus érythémateux systémique
LMC	Leucémie myéloide chronique
LNK	Lymphocyte adaptator protein
LNK	Lymphocyte NK
LPS	Lipopolysaccharide

LSK	Lin-sca+ckit+
LT	Lymphocyte T
Lu/BCAM	erythroid Lutheran/Basal cell-adhesion molecule
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAT	Microangiopathie thrombotique
MFP	Myélofibrose primitive
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MK	Mégacaryocyte
MMP9	Matrix metallopeptidase 9
MP	Microparticule
MPA	Microscopic polyangeitis
MPL	Myeloproliferative leukemia
MPO	Myelopéroxydase
mTOR	Mechanistic target of rapamycin
NAC	N-acétyl-cystéine
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NE	Neutrophil elastase
NET	Neutrophil extracellular trap
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NMP	Néoplasie myéloprolifératives
NO	Nitric oxyde
NOS	Nitric oxyde synthase
NZM	New Zealand Mixed
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PAD4	Peptidyl arginine deiminase 4
PAEC	Pulmonary arterial endothelial cell
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor-1
PAR-1	Protease-activated receptor
PC	Protéine C
PCA	Protéine C activée
pDC	plasmactytoid dendritic cells
PDGF	Platelet derived growth factor
PDI	protéine disulfide isomérase
PDK1	Phosphatidylinositol 3-dependant kinase 1
PEC	Progéniteur endothelial circulant
PF4	Platelet factor 4
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated STAT
PMA	Phorbol-myristate-acétate
PMVEC	Pulmonary microvascular endothelial cell
PNE	Polynucléaire éosinophile
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PR3	Protéinase 3
PS	Protéine S

PSGL1	P-Selectin glycoprotein ligand 1
PTT	Purpura thrombotique thrombocytopénique
PV	Polyglobulie de Vaquez
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RNP	Ribonucleoprotein
ROS	Reactive oxygen species
RPCA	Résistance à la protéine C activée
RR	Risque relatif
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SAPK	Stress Activated Protein Kinase
SAPL	Syndrome des anti-phospholipides
SCID	Severe combined immunodeficiency
SF3B1	Splicing factor 3b subunit 1
SH2	Src homology 2
SHP1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SHU	Syndrome hémolytique et urémique
SLPI	Secretory peptidase leukocyte inhibitor
SOCS	Suppressor of cytokine signalling
SOS	Son of sevenless homolog
SRSF2	Serin and arginine rich splicing factor 2
STAT	Signal activator and activator of transcription
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1
TAT	Thrombine anti-thrombine
TE	Thrombocytémie essentielle
TET2	Ten eleven translocation 2
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll like receptor
TM	Thrombomoduline
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissular plasminogen activator
TPO	Thrombopoiétine
TXA2	Thromboxane A2
TXB2	Thromboxane B2
TYK 2	Tyrosine kinase 2
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VCI	Veine cave inférieure
VEGF	Vascular endothelial growtj factor
vWF	von Willebrand factor
WT	Wild-type

Liste des figures

		Pages
Figure 1 :	Schéma de l'hématopoièse humaine	24
Figure 2 :	Schéma de l'hématopoièse en présence de la mutation JAK2V617F	26
Figure 3 :	Classification des NMP par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), révisée en 2016	27
Figure 4 :	Evolution des néoplasies myéloprolifératives (NMP)	28
Figure 5 :	Structure des protéines JAK	34
Figure 6 :	La signalisation des récepteurs aux cytokines via la voie JAK2	36
Figure 7 :	Mutation V617F de la protéine JAK2	37
Figure 8 :	Mutation de la Calréticuline (CALR) au cours de la thrombocytémie essentielle et de la myélofibrose primitive	41
Figure 9 :	Schéma de l'hémostase humaine	44
Figure 10 :	Schéma de la cascade de la coagulation	47
Figure 11 :	Schéma des mécanismes participant à la survenue de thrombose artérielle	51
Figure 12 :	Rôle anticoagulant du compartiment endothélial	53
Figure 13 :	Schéma des mécanismes participant à la survenue de thrombose veineuse	54
Figure 14 :	Physiopathologie de la thrombose au cours des néoplasies myéloprolifératives	56
Figure 15 :	Algorithme de prise en charge de la thrombocytémie essentielle	84
Figure 16 :	Algorithme de prise en charge de la polyglobulie de Vaquez	85
Figure 17 :	Mécanismes participant à la participation des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) dans la vasculogénèse post-natale	91
Figure 18 :	Etudes ayant mis en évidence la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales (CE) de patients avec NMP JAK2V617F +	99
Figure 19 :	Mécanismes de NETose	104
Figure 20 :	Recrutement des leucocytes au site de thrombose	110
Figure 21 :	Mécanismes de promotion de la thrombose par les neutrophil extracellular traps (NET)	112
Figure 22 :	Voies d'inhibition de la NETose	120
Figure 23 :	Hypothèses de survenue de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial	240
Figure 24 :	Données préliminaires sur l'adhésion de PNN de patients avec NMP en présence d'HUVEC JAK2WT et JAK2V617F	251
Figure 25 :	Hypothèses de mécanismes de promotion de la NETose par la mutation JAK2V617F	260
Figure 26 :	Mécanismes possibles d'interaction entre les cellules endothéliales JAK2V167F et les polynucléaires neutrophiles avec mutation JAK2V617F	265
Tableau 1 :	Comparatif des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) précoces et tardifs	92

Introduction

1ère partie : Les néoplasies myéloprolifératives

I. Généralités sur l'hématopoïèse et les cellules souches hématopoiétiques

Le sang est composé de différents types cellulaires ayant différentes fonctions, de la production d'anticorps (lymphocytes B) au transport d'oxygène (globules rouges) en passant par l'hémostase (plaquettes) ou bien la défense anti-infectieuse (polynucléaires neutrophiles). Malgré des durées de vie variables selon le type cellulaire (120 jours pour les globules rouges, 7 à 10 jours pour les plaquettes, 24 heures pour les polynucléaires neutrophiles), le nombre de cellules sanguines circulantes reste constant dans le sang périphérique, du fait d'un renouvellement perpétuel. Ce renouvellement continu et régulé prend sa source au niveau d'un faible nombre de cellules, les cellules souches hématopoiétiques (CSH), dotées de capacités d'auto-renouvellement et de prolifération qui vont donner naissance à toutes les cellules des différentes lignées sanguines.

C'est ce processus qu'on nomme hématopoïèse **(Figure 1)**. Dans la moelle osseuse, de manière schématique, on distingue trois grands types cellulaires :

- les cellules souches hématopoiétiques, douées de propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation vers l'ensemble des lignées hématopoiétiques. Elles sont dites multipotentes et leurs capacités de prolifération sont faibles.
- les progéniteurs hématopoiétiques, qui n'ont pas de propriétés d'auto-renouvellement mais peuvent proliférer et se différencier. Ces cellules sont engagées dans l'une des différentes lignées cellulaires.
- les précurseurs, cellules en cours de maturation et sans capacités de prolifération.

La différenciation terminée, les cellules sanguines matures passent dans la circulation sanguine pour jouer leur rôle.

Deux grandes lignées sont classiquement séparées :

- la lignée lymphoïde dans laquelle on retrouve les lymphocytes B, T et natural killer (NK).
- la lignée myéloïde dans laquelle on retrouve les globules rouges, les plaquettes, les polynucléaires (neutrophiles et éosinophiles) et les monocytes.

L'hématopoïèse est un processus complexe finement régulé. Ce processus implique en premier lieu une régulation cellulaire représentée par des facteurs de transcription exprimés différentiellement selon le type cellulaire, le stade de l'hématopoïèse, la lignée cellulaire. Ces facteurs de transcription, up- ou down-régulés, conduiront notamment vers la différenciation cellulaire vers l'une ou l'autre des lignées en se fixant à l'ADN via des motifs spécifiques permettant *in fine* l'expression de gènes cibles. L'autre régulation en jeu est une régulation exogène assurée par des facteurs de croissance hématopoïétique, sécrétés par des cellules à distance (on parle de régulation endocrine), à proximité (régulation paracrine) ou par les cellules elles-mêmes (régulation autocrine). Ces facteurs se lient à des récepteurs spécifiques situés à la surface des cellules hématopoiétiques : on parlera alors de couple ligand-récepteur. On peut différencier les facteurs de régulation positive (comme le G-CSF, le M-CSF, la thrombopoïétine ou l'érythropoïétine) ou négative (comme le TGF-béta ou le TNF-alpha). Même s'il est plus commode de séparer en deux grands ensembles les acteurs de cette régulation, ceux-ci sont cependant intimement liés, la fixation d'un ligand sur son récepteur entraînant l'activation intra cellulaire de voies d'aval conduisant à une expression différentielle de facteurs de transcription, qui conduira à la mise en place de boucles de régulation positive ou négative sur la sécrétion des ligands exogènes, et cætera, ...

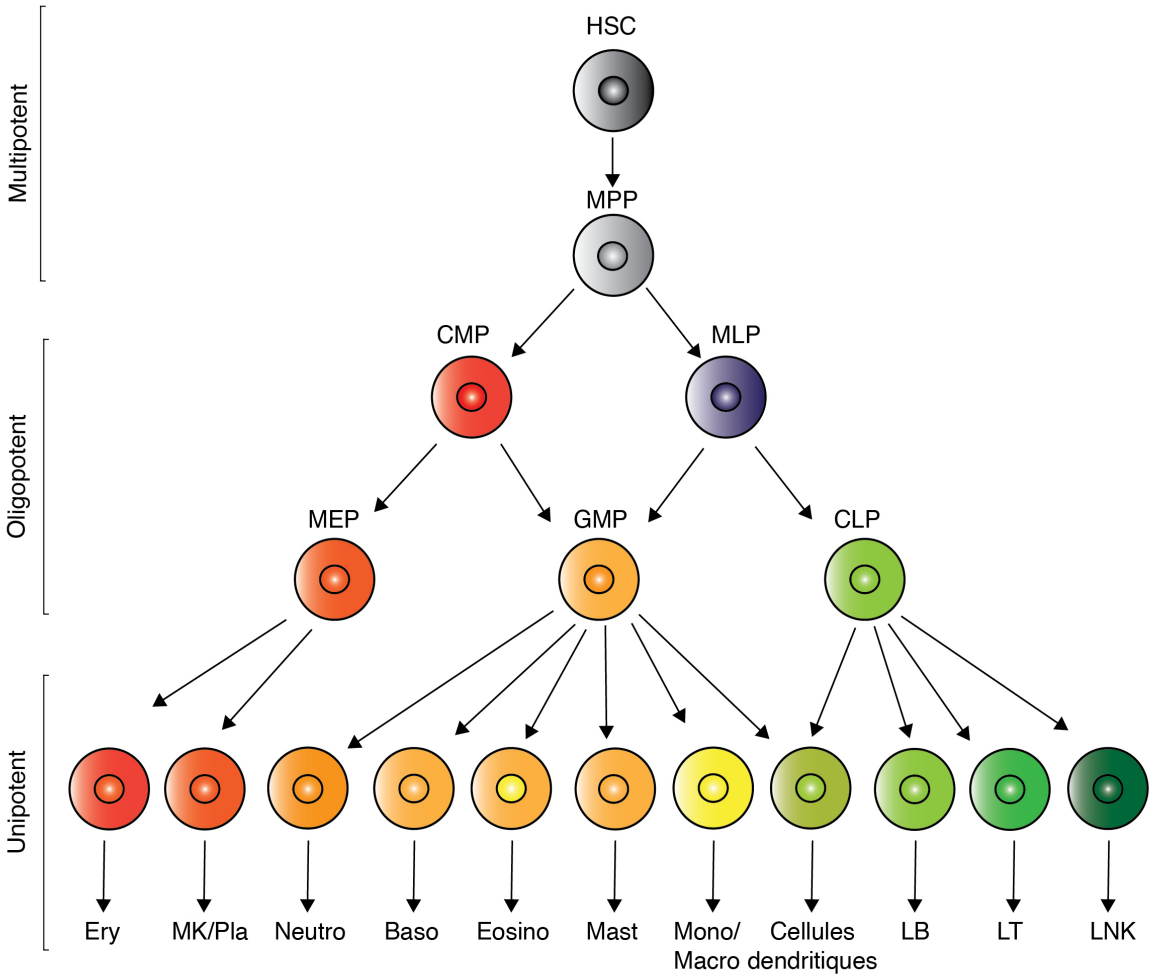


Figure 1 : Schéma de l'hématopoièse humaine

Les cellules souches hématopoiétiques (CSH) ont des capacités d'auto-renouvellement et de prolifération. Une CSH se divise de façon asymétrique pour donner naissance à une CSH et une autre cellule « engagée » dans un processus de différenciation. Schématiquement, l'hématopoièse se scinde en trois compartiments : cellules à potentiel multipotent, à potentiel oligopotent, et cellules à potentiel unipotent.

Abréviations : HSC, hematopoietic stem cell ; MPP, multipotent progenitor ; CMP, common myeloid progenitor ; MLP, multilymphoid progenitor ; MEP, megakaryocyte/eryhtroid progenitor ; GMP, granulocyte/myeloid progenitor, CLP, common lymphoid progenitor; Ery, erythrocytes; MK/Pla, megakaryocyte/platelet; Neutro, neutrophils; baso, basophils; eosino, eosinophils; mast, mastocytes; mono/macro, monocytes,macrophages; LB, lymphocytes B; LT, lymphocytes T; LNK, lymphocytes natural killer.

Figure adaptée de la figure de Antoniani et co-auteurs dans l'article « Epigenetic Regulation of Hematopoiesis : Biological Insights and Therapeutic Applications », Stem Cells Translational Medicine, 2016.

II. Classification et caractéristiques cliniques des néoplasies myéloprolifératives

Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) dites classiques comportent quatre entités cliniques : la leucémie myéloïde chronique (LMC) caractérisée par la présence du gène de fusion BCR-ABL et les NMP BCR-ABL négatif incluant la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP). Les NMP BCR-ABL négatif sont les maladies les plus fréquentes parmi les néoplasies myéloprolifératives et sont caractérisées par la production excessive de cellules sanguines différentiées, matures et pleinement fonctionnelles. Toutes les NMP sont la conséquence d'une mutation acquise au niveau d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) qui va proliférer de manière clonale. Cette prolifération clonale va s'accompagner d'une hyperplasie d'une ou plusieurs lignées.

Trois lignées hématopoiétiques sont principalement touchées **(Figure 2)** :

- la lignée mégacaryocytaire/plaquettaire dans la TE,
- la lignée érythrocytaire dans la PV,
- les lignées mégacaryocytaire et granuleuse dans la MFP.

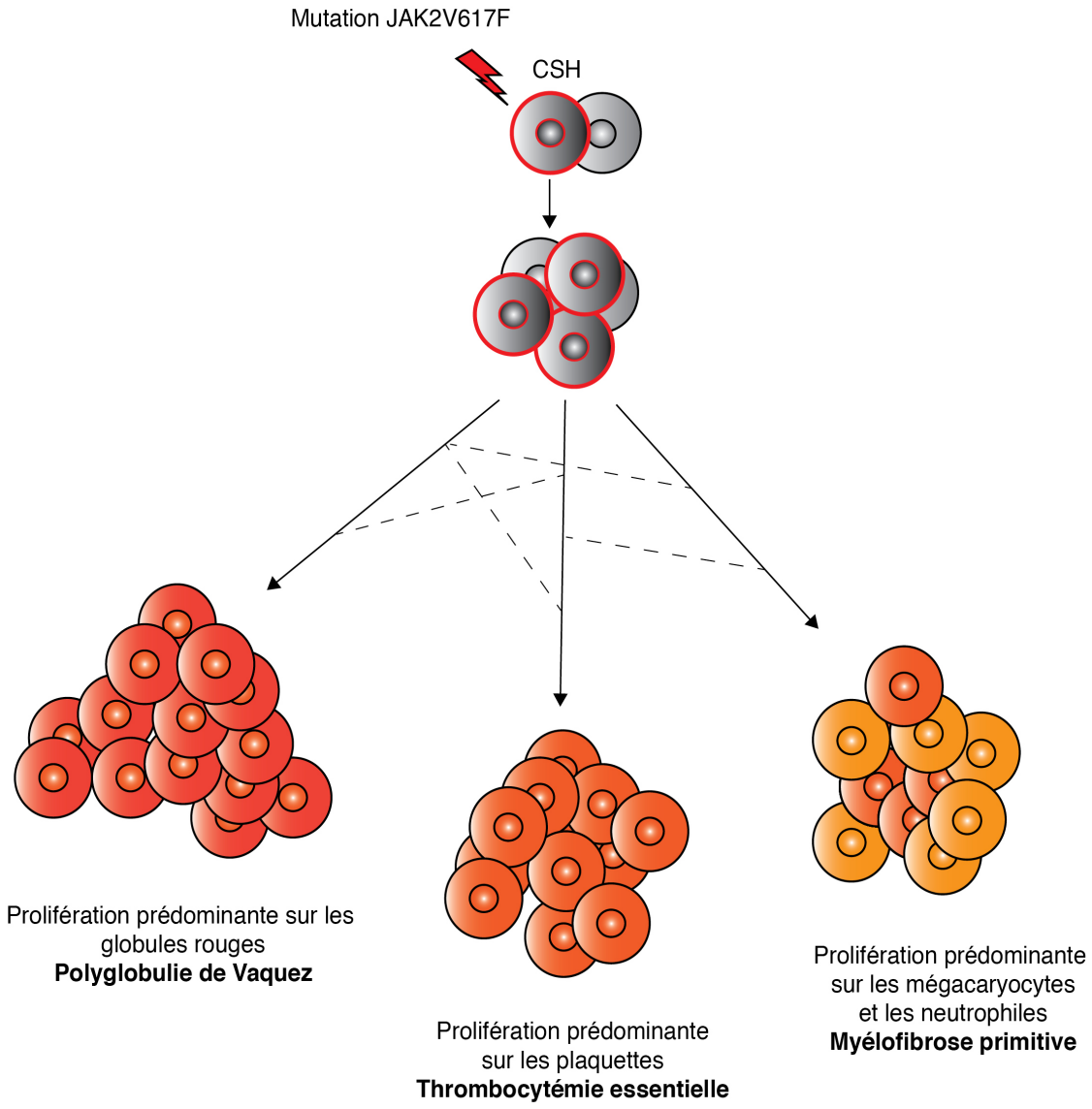


Figure 2 : Schéma de l'hématopoièse en présence de la mutation JAK2V617F
La mutation acquise JAK2V617F apparaît dans une cellule souche hématopoiétique (CSH), conférant un avantage prolifératif clonal aux CSH. La prolifération prédominante dans la lignée érythroide mène à la polyglobulie de Vaquez (PV), dans la lignée mégacaryocytaire à la thrombocytémie essentielle (TE), dans la lignée mégacaryocytaire et neutrophile à la myélofibrose primitive (MFP).

Bien que les présentations cliniques de ces trois différentes NMP soient distinctes dans leurs formes typiques, le diagnostic précis peut parfois se révéler difficile, d'où la nécessité de critères diagnostiques précis comme ceux établis par l'Organisation Mondiale de la Santé, révisés dernièrement en 2016 **(Arber et al., 2016) (Figure 3)**.

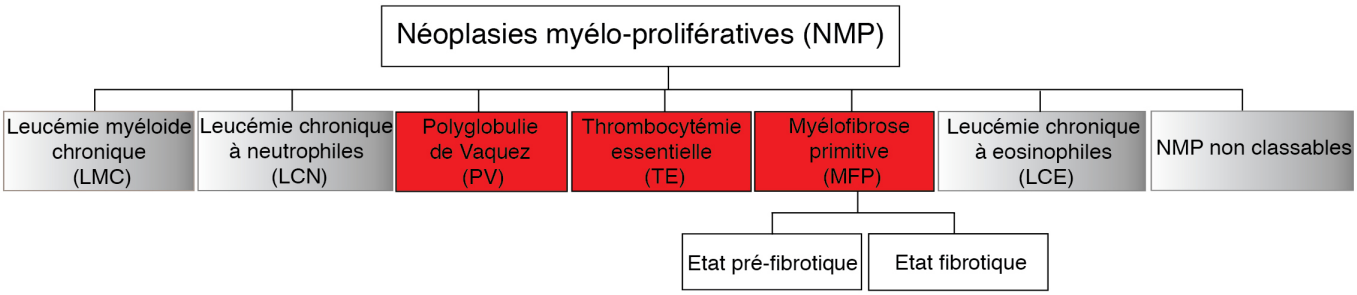


Figure 3 : Classification des NMP par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), révisée en 2016
Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) comprennent les NMP avec mutation JAK2V617F : polyglobulie de Vaquez (PV), thrombocythémie essentielle (TE) et myélofibrose primitive (MFP). En 2016, ont été ajoutées les notions de MFP pré-fibrotique et MFP fibrotique.
Parmis les autres NMP, on distingue la leucémie myéloide chronique (LMC) (avec transcrit de fusion BCR-ABL), la leucémie chronique à neutrophiles (LCN), la leucémie chronique à eosinophiles (LCE). Les autres NMP sont classées dans le groupe « inclassables ».

De plus, le diagnostic précis est rendu compliqué par l'existence dans un certain nombre de cas d'un continuum entre ces différentes entités **(Rumi et al., 2014)**. Notamment, la TE peut progresser vers la MF ou évoluer en PV. La PV peut également évoluer vers la MF **(Figure 4)**. Caractéristique de ce brouillement des frontières entre ces différentes maladies, ces dernières années ont vu émerger des entités « frontières » comme la myélofibrose préfibrotique (ou myélofibrose précoce) caractérisée au diagnostic par un phénotype de TE mais avec un risque plus élevé d'évolution vers la MF et un diagnostic plus sombre que la TE **(Barbui et al., 2011a)**.

Les NMP atypiques sont représentées par la LMC atypique, la leucémie chronique à neutrophiles (LCN) et la leucémie chronique à éosinophiles (LCN).

Les NMP inclassables sont des entités cliniques rares ne pouvant être classifiées dans aucune des catégories précédentes.

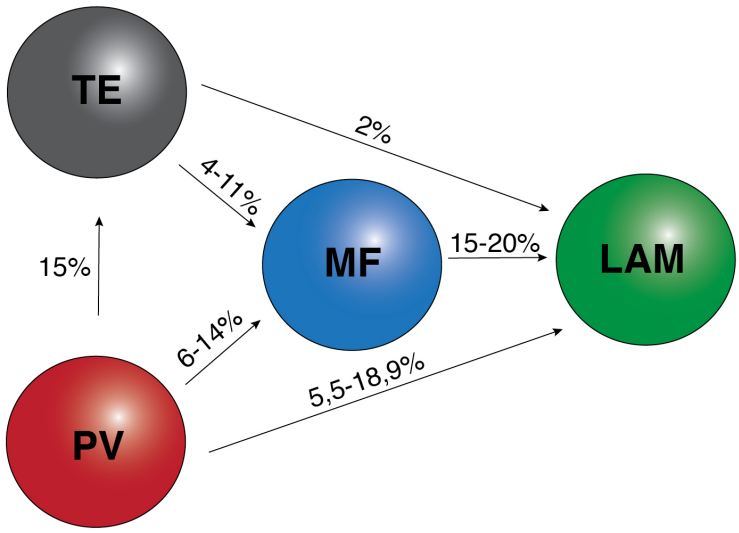


Figure 4 : Evolution des néoplasies myéloprolifératives (NMP)
Il y a un continuum entre les différentes NMP : la polyglobulie de Vaquez (PV) peut évoluer en thrombocytémie essentielle (TE), et ces deux maladies peuvent évoluer en myélofibrose (MF) secondaire. La TE, la PV et la MF peuvent évoluer en leucémie aigue myéloide (LAM), de manière plus fréquente pour la MF.

A. La thrombocytémie essentielle (TE)

La thrombocytémie essentielle est caractérisée par une prolifération prédominante sur la lignée mégacaryocytaire/plaquettaire, entraînant au niveau sanguin la présence d'une thrombocytose (taux de plaquettes supérieur à 450G/L). L'âge moyen au diagnostic est de 50 ans avec une légère prédominance féminine. L'incidence de cette maladie est de 1,5 à 2 patients pour 100 000 habitants par an **(Tefferi and Barbui, 2017)**. L'entrée dans la maladie peut se faire par une prise de sang qui retrouvera une thrombocytose et fera réaliser des examens chez un patient asymptomatique. Dans un certain nombre de cas, un évènement thrombotique ou hémorragique peut constituer le mode d'entrée dans la maladie. Certaines fois, des symptômes cliniques liés à des troubles de la microcirculation sont présents : érythermalgie, céphalées, paresthésies des extrémités. Sur le plan clinique, on peut retrouver la présence d'une splénomégalie. Le diagnostic se fera donc sur des arguments biologiques (présence d'une thrombocytose parfois accompagnée d'une leucocytose à polynucléaires neutrophiles), moléculaires (présence d'une mutation *JAK2*, *CALR* ou *MPL* dans respectivement 58%, 23% et 4% des cas) et anatomopathologiques (aspect d'hyperplasie de la lignée mégacaryocytaire sans myélofibrose ou avec fibrose de grade I à la biopsie ostéo-médullaire).

Les critères diagnostiques établis par l'OMS en 2008 **(Vardiman et al., 2009)** ont été révisé en 2016 et comportent des critères majeurs qui sont les suivants :

- thrombocytose supérieure à 450G/L
- biopsie ostéo-médullaire montrant une prolifération prédominante sur la lignée mégacaryocytaire avec des mégacaryocytes (MK) de taille augmentée et avec des noyaux polylobés sans fibrose réticulinique ou très rare (grade I).
- présence d'une mutation au niveau de *JAK2*, *CALR* ou *MPL*
- absence de critères pour une LMC, une PV, une MFP, un syndrome myélodysplasique ou une autre néoplasie myéloprolifération.

Le critère mineur est :

- présence d'un marqueur de clonalité et absence de thrombocytose réactionnelle.

Pour établir le diagnostic, il faut la présence des 4 critères majeurs ou la présence de 3 critères majeurs et du critère mineur. Les critères établis en 2016 pour le diagnostic de TE diffèrent peu des critères précédemment établis en 2008. A noter l'ajout de la mutation *CALR*, découverte en 2013, et la mise en lumière de l'importance de bien différencier la TE de la MFP préfibrotique qui ont des pronostics différents.

Les risques principaux de cette maladie sont la survenue d'évènements thrombotiques ou hémorragiques, la progression vers une myélofibrose, la transformation en leucémie aiguë.

B. La Polyglobulie de Vaquez (PV)

La Polyglobulie de Vaquez est caractérisée par une prolifération prédominante sur la lignée érythrocytaire, entraînant au niveau sanguin une élévation de l'hémoglobine ou de l'hématocrite. Son incidence est proche de celle de la TE avec la découverte de la maladie chez 1 patient pour 100 000 habitants par an **(Tefferi and Barbui, 2017)**. Cette maladie touche le plus souvent des patients âgés de plus de 50 ans (médiane de survenue de 60 ans), avec une prédominance masculine. Comme pour la thrombocytémie essentielle, l'entrée dans la maladie peut se faire via une prise de sang qui retrouvera une élévation de l'hémoglobine ou de l'hématocrite, parfois accompagnée d'anomalies des autres lignées myéloïdes (thrombocytose, hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles). D'autres fois, la maladie sera mise en évidence à l'occasion d'un évènement thrombotique ou hémorragique. Les symptômes présentés par les patients sont souvent plus « bruyants » qu'au cours de la thrombocytémie essentielle avec notamment la présence d'un prurit aquagénique, de symptômes liés à des anomalies de la microcirculation et à

l'hyperviscosité (céphalées, paresthésies, flou visuel, acouphènes). Parmi les signes cliniques, on peut retrouver une érythrocytose cutanéo-muqueuse évocatrice et parfois une splénomégalie. Le diagnostic se fera donc sur des arguments biologiques (présence d'une élévation de l'hémoglobine et/ou de l'hématocrite, parfois accompagnée d'une thrombocytose ou d'une leucocytose à polynucléaires neutrophiles), moléculaires (présence d'une mutation JAK2V617F ou d'une mutation *JAK2* au niveau de l'exon 12 dans respectivement 96% et 2% des cas) et anatomopathologiques (aspect d'hyperplasie des lignées érythroblastique, granuleuse et mégacaryocytaire). Un taux d'érythropoïétine (EPO) bas, signe d'une tentative de freinage de la prolifération érythrocytaire, est souvent retrouvé.

Les critères majeurs de la classification de l'OMS 2016 sont :

- un taux d'hémoglobine supérieur à 16,5g/dl chez l'homme et 16g/dl chez la femme, OU un hématocrite supérieur à 49% chez l'homme ou 48% chez la femme, OU une augmentation de la masse globulaire (>25% par rapport à la normale)
- une hypercellularité des trois lignées myéloïdes à la biopsie ostéo-médullaire avec présence de mégacaryocytes de tailles différentes
- la présence de la mutation V617F ou de l'exon 12 de *JAK2*

Le critère mineur est :

- un taux d'érythropoïétine (EPO) inférieur à la normale

Pour établir le diagnostic, il est nécessaire de remplir les 3 critères majeurs ou les 2 premiers critères majeurs et le critère mineur.

Des modifications substantielles de la classification sont donc apparues entre 2008 et 2016.

Premièrement, les critères de taux d'hémoglobine et d'hématocrite ont été abaissés dans le souci de distinguer les TE avec mutation JAK2 des PV dites « masquées » **(Barbui et al., 2014a)(Barbui et al., 2014b)**. Cela s'est traduit par une diminution des taux discriminatifs de taux d'hémoglobine (de 18,5g/d à 16,5 g/dl pour les hommes, de 16,5 g/dl à 16 g/dl pour les femmes) et d'hématocrite (de 51 à 49% chez les hommes). L'abaissement des seuils d'hémoglobine et d'hématocrite pourrait amener à des investigations plus importantes chez des patients avec PV « potentielles » avec à l'inverse la possibilité de diagnostic de PV chez un plus grand nombre de patients, comme l'a montré une étude récente **(Misawa et al., 2017)**. Les patients avec PV « masquées » sont donc des patients avec thrombocytose, présence d'une

mutation JAK2V617F mais sans polyglobulie selon la classification OMS 2008. C'est la mesure de la masse sanguine et/ou la réalisation d'une BOM qui permettra de les différencier des patients avec TE. A même risque thrombotique que les patients avec PV, ces patients seraient plus à risque d'évolution vers une LA ou une MF **(Barbui et al., 2014a)**.

L'autre modification majeure est la « promotion » de critère mineur en critère majeur de l'aspect anatomo-pathologique retrouvé à la BOM. Le but principal de cette modification étant d'évaluer la fibrose médullaire au diagnostic, présente chez plus de 20% des patients. La présence d'une fibrose médullaire est un facteur de risque d'évolution en MF, sans toutefois que l'évolution en LA ou la survie globale soit impacté **(Barbui et al., 2012a)**. La classification de 2016 précise toutefois qu'il est possible de surseoir à la réalisation de cette biopsie ostéo-médullaire en présence de taux d'hémoglobine très élevés (>18,5g/dl chez l'homme ou 16,5g/dl chez la femme), de taux d'hématocrite très élevés (>55,5% chez l'homme ou 49,5% chez la femme) ou en présence d'une anomalie moléculaire (critère majeur 3) associée à une diminution du taux d'EPO (critère mineur). Enfin, il est à noter que le diagnostic de PV peut se faire en l'absence de mutation de *JAK2* (V617F ou de l'exon 12), bien que ce soit rarissime. Enfin, le critère de pousse spontanée des progéniteurs érythroides a été retiré de cette nouvelle classification.

Comme au cours de la TE, les risques principaux sont celui de la thrombose au niveau artériel ou bien veineux, ainsi que l'évolution vers une myélofibrose secondaire ou une leucémie aiguë.

C. La myélofibrose primitive (MFP)

La myélofibrose primitive est caractérisée par une prolifération prédominante sur les lignées mégacaryocytaire et granuleuse, une fibrose médullaire et une hématopoïèse extra-médullaire, au niveau splénique ou hépatique. C'est une pathologie rare qui atteint préférentiellement des hommes, âgés de plus de 60 ans (médiane d'âge de survenue : 64 ans) et dont le pronostic est le plus sévère parmi toutes les NMP. On distingue la myélofibrose primitive de la myélofibrose secondaire à une TE ou une PV **(Tefferi, 2017)**.

La fibrose médullaire est responsable de cytopénies avec la prévalence fréquente d'une anémie. Les signes cliniques sont donc parfois liés à cette anémie (asthénie, dyspnée, pâleur cutanéomuqueuse). La mise en place d'une hématopoïèse extra-médullaire va entraîner une

splénomégalie, fréquente, et une hépatomégalie, plus rare. Ces organomégalies peuvent se retrouver à l'examen clinique avec des symptômes tels qu'une pesanteur au niveau de l'hypochondre gauche ou droit et la palpation du foie ou de la rate, parfois très volumineuse. Des signes généraux sont présents chez environ un tiers des patients : asthénie, amaigrissement, anorexie, fièvre, sueurs nocturnes.

Sur le plan biologique, la numération formule sanguine retrouvera la présence d'une leucocytose accompagnée d'une ou plusieurs cytopénies et parfois d'une myélémie, voire de cellules immatures (CD34+) circulantes. Le frottis sanguin peut parfois mettre en évidence la présence de globules rouges déformés, en forme de larmes, appelés dacryocytes, ce qui est un signe évocateur de la maladie.

Sur le plan moléculaire, les mutations conductrices responsables sont une mutation V617F de JAK2 dans 53% des cas, une mutation de CALR dans 33% des cas, et une mutation de MPL dans 7% des cas **(Tefferi, 2017)**.

L'analyse anatomopathologique de la moelle retrouvera des mégacaryocytes dysplasiques et une fibrose médullaire caractérisée par la présence de fibres de collagène et de réticuline (grade II ou III). Il est parfois mis en évidence des signes de néoangiogénèse augmentée, secondaire à la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques d'origine mégacaryocytaire et monocytaire (TGF-b, FGF, VEGF, PDGF). Enfin, on retrouve fréquemment une ostéosclérose.

Les critères diagnostiques selon la classification de l'OMS 2016 comportent également des critères majeurs et des critères mineurs.

Les critères majeurs sont :

- présence à la biopsie ostéo-médullaire d'une prolifération de la lignée mégacaryocytaire avec atypies, associé à une fibrose constituée de fibres de collagène et/ou de réticuline de grade II ou III.
- absence de critères pour une LMC, une PV, une MPF, un syndrome myélodysplasique ou une autre néoplasie myéloproliférative.
- présence d'une mutation *JAK2*, *CALR* ou *MPL* OU si absence d'une de ces mutations, présence d'un marqueur de clonalité (mutation de *ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/2, SRSF2, SF3B1*) OU absence de fibrose réticulinique secondaire (à un processus infectieux, auto-immun ou inflammatoire, à une leucémie à tricholeucocytes, à un néoplasie lymphoïde, à une néoplasie métastasée, à un processus toxique).

Les critères mineurs sont :

- une anémie après exclusion d'une autre cause d'anémie
- une leucocytose (taux de globules blancs supérieur à 11 G/L)
- une splénomégalie (à la palpation)
- une leucoérythroblastose
- une élévation du taux de lactate déshydrogénase (LDH)

Le diagnostic de MFP nécessite la présence des 3 critères majeurs et d'un critère mineur.

Parmi les modifications apportées par la classification OMS de 2016, il est à noter l'apparition de critères diagnostiques pour la MFP pré-fibrotique. La plupart des patients avec MFP pré-fibrotique ayant une thrombocytose **(Barosi et al., 2012)**, il est nécessaire de pouvoir les différencier des patients atteints de TE. La différenciation entre la MFP et la MFP pré-fibrotique se fait à l'examen de la biopsie ostéo-médullaire. Les critères anatomopathologiques de MFP pré-fibrotique sont, comme dans la MFP, la présence d'une prolifération mégacaryocytaire mais sans présence de fibrose (grade I au maximum) associée à la présence d'une cellularité augmentée, d'une prolifération de la lignée granuleuse et une lignée érythrocytaire souvent diminuée. En dehors du critère « leucoérythroblastose », les critères mineurs entre la MFP et la MFP pré-fibrotique sont les mêmes. En pratique, la MFP pré-fibrotique est un mode de présentation de la MFP **(Barosi et al., 2012)** avec un pronostic intermédiaire entre les patients avec TE et les patients avec MFP **(Barbui et al., 2011a)**. Ces différences de pronostic justifient donc l'établissement d'une distinction entre MFP et MFP pré-fibrotique.

Les complications au cours de la MFP sont d'ordre hémorragiques et infectieuses en phase cytopénique, avec également des complications liées à l'anémie et à la nécessité de transfusions itératives (hémosidérose), des complications liées à la splénomégalie (hypersplénisme, hémodilution, compressions locales). Moins fréquentes qu'au cours de la TE et de la PV, on retrouve des complications thrombotiques. Enfin, le risque principal est celui de la transformation en LA qui peut toucher 20% des cas.

III. Anomalies biologiques et moléculaires des NMP non-LMC (ou BCR-ABLnégatif)

A. La mutation JAK2V617F

a. *La protéine JAK2*

JAK2 fait partie de la famille des Janus Kinase (JAK). Les autres membres de cette famille sont JAK1, JAK3 et TYK2. Ce sont des protéines cytoplasmiques à activité tyrosine-kinase. Fixées aux récepteurs aux cytokines de type 1 et 2 qui sont dépourvus d'activité enzymatique, elles permettent la transduction du signal. Chez les mammifères, JAK1, JAK2, TYK2 sont ubiquitaires alors que JAK3 est principalement présente au niveau hématopoïétique. Ces protéines sont composées de 7 domaines, présentant des similarités de séquence, appelés JH1-JH7 (JAK homology), et organisés en 4 grands domaines. En N-terminal, on trouve le domaine FERM (composé des sous-domaines JH5, JH6, et JH7) qui permet la liaison à la région « box 1 » située au niveau du récepteur de kinase associé. JH3 et JH4 composent le domaine d'homologie à SH2 (Src Homology 2), structurellement important pour la spécificité d'interaction avec le récepteur et pour la liaison à des résidus tyrosine phosphorylés d'autres protéines. En C-terminal, on retrouve deux domaines conservés : le domaine kinase JH1 et le domaine pseudo-kinase JH2, qui régule négativement le domaine JH1. Le domaine JH1 est le domaine à activité tyrosine-kinase, qui permet donc la phosphorylation des protéines. Ce domaine possède également un site catalytique, ou boucle d'activation, permettant son activation. Cette activation se fait au niveau de la tyrosine Y1007 (seule ou en association avec Y1008) **(Feng et al., 1997)**. Le domaine JH2, dépourvu d'activité catalytique, joue un rôle inhibiteur du domaine JH1**(Lindauer et al., 2001)(Sanz et al., 2011) (Figure 5)**.

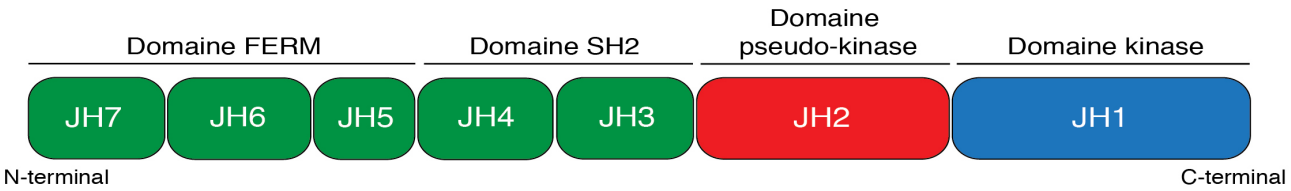


Figure 5 : Structure des protéines JAK *- La protéine JAK comporte sept domaines structuraux nommés JH (« JAK homology ») conservés entre les espèces. En N-terminal, les domaines JH7, JH6, et JH5 constituent le domaine FERM, permettant la liaison de la protéine au récepteur de cytokines. Les domaines JH3 et JH4 constituent le domaine SH2 (Src Homology 2), permettant la liaison de la protéine aux résidus tyrosine phosphorylés d'autres protéines. Le domaine JH2 est le domaine pseudo-kinase qui joue le rôle d'inhibition sur le domaine kinase JH1. Le domaine JH1 est le domaine tyrosine kinase de la protéine, permettant la phosphorylation de résidus tyrosine d'autres protéines.*

b. Les voies de signalisation en aval de JAK2

Les récepteurs aux cytokines sont composés d'un domaine extra-cellulaire spécifique du ligand, d'un domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine intra-cellulaire, domaine responsable de la transduction du signal. On classe les récepteurs aux cytokines en deux types, fonction de leur structure tridimensionnelle : (i) les récepteurs de type 1 qui signalent via une seule sous-unité et qui peuvent eux-mêmes être subdivisés en quatre sous-groupes : récepteurs homodimériques (comme EPO-R, TPO-R), récepteurs hétérodimériques possédant la sous-unité « ßc » (comme GM-CSFR), récepteurs hétérodimériques possédant la sous-unité « gp-130 » (comme IL6-R), récepteurs hétérodimériques possédant la sous-unité « gamma-C » (comme IL2-R), (ii) les récepteurs de type 2 qui signalent via deux sous-unités et qui regroupent notamment la famille des récepteurs aux interférons **(Baker et al., 2007)**. Au cours des NMP, ce sont principalement les lignées mégacaryocytaire, granuleuse et érythrocytaire qui sont atteintes. Les principaux récepteurs impliqués seront donc le récepteur à la thrombopoïétine (ou MPL), à l'érythropoïétine (EPO-R), au G-CSF (G-CSFR).

Ces récepteurs sont caractérisés par la présence :

- au niveau de leur domaine extracellulaire : de quatre résidus cystéine conservés, d'un domaine WSXWS, et de domaines fibronectine de type III.
- au niveau de leur domaine intracellulaire : de boxs 1 et 2.

L'interaction entre JAK2 et le récepteur se fait entre le domaine FERM de JAK2 et la box 1 du récepteur. JAK2 se fixe au niveau du récepteur et joue un rôle de protéine chaperonne au niveau du réticulum endoplasmique, favorisant sa stabilité et sa montée à la surface cellulaire via la voie canonique (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, vésicules, membrane plasmique). La fixation de la cytokine au récepteur induit une modification conformationnelle ainsi qu'une homodimérisation ou oligomérisation du récepteur. Cela a pour conséquences un rapprochement des protéines JAK2, une autophosphorylation au niveau des tyrosines Y1007 et Y1008, ainsi qu'une trans-phosphorylation de tyrosines conservées au niveau des domaines intra-cellulaires des récepteurs, permettant le recrutement de protéines avec un domaine SH2, comme celles de la voie de signalisation STAT, MAPK et PI3K/AKT. Le recrutement de ces protéines permet l'activation de voies de signalisation menant à la survie, la prolifération et la différenciation des cellules **(Figure 6)**.

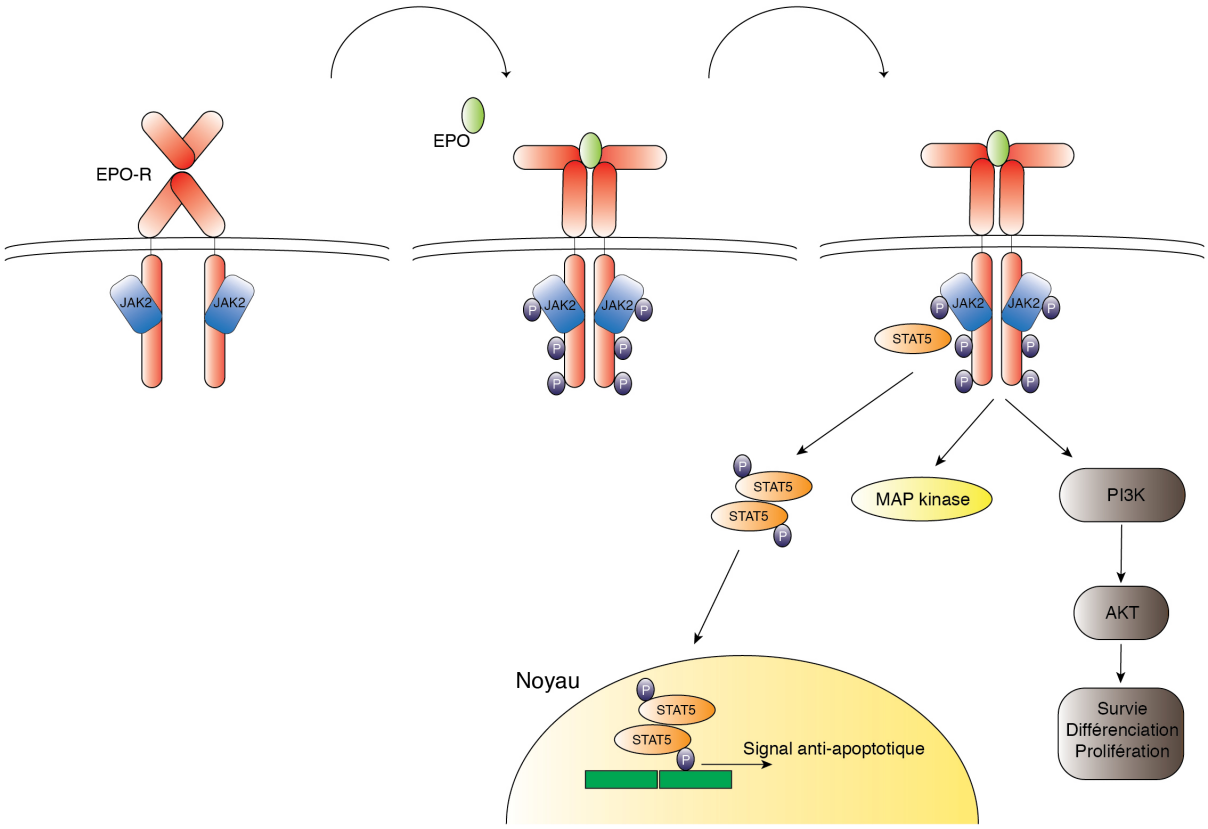


Figure 6 : La signalisation des récepteurs aux cytokines via la voie JAK2

En absence de ligand, les protéines JAK2 sont liées au domaine cytoplasmique du récepteur aux cytokines dans un état inactif. La fixation de la cytokine sur son récépteur entraîne une modification de la conformation de celui-ci, permettant le rapprochement des protéines JAK2. Ce rapprochement est accompagné par l'activation et la transphosphorylation des protéines JAK. Une fois activées, les protéines JAK2 phosphorylent le récépteur, permettant le recrutement des protéines STAT, PI3K et adaptatrices à son niveau. Les protéines STAT, en dimère, migrent au niveau du noyau jouant un rôle de facteurs de transcription. Les voies MAP kinase et PI3K/AKT sont également activées, induisant la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire.

Figure adaptée de la figure de James et ses co-auteurs dans l'article « A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects», Trends in Molecular Medicine, 2006.

c. *La mutation JAK2V617F*

En 2005, la découverte d'une anomalie récurrente au cours des NMP BCR-ABL négatifs a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie de ces maladies ainsi qu'une aide diagnostique considérable : il s'agit de la mutation JAK2V617F, mutation acquise et clonale située au niveau du gène codant pour la protéine à activité tyrosine kinase JAK2 **(James et al., 2005)(Kralovics et al., 2005)(Baxter et al., 2005)(Levine et al., 2005).** La mutation JAK2V617F est la mutation retrouvée le plus fréquemment au cours des NMP BCR-ABL -, dans plus de 95% des cas de PV, et 50 à 60% des cas de TE et MFP. Cette mutation résulte du

remplacement d'une guanine en thymidine, entraînant la substitution d'une valine en phénylalanine en position 617, dans le domaine pseudokinase de JAK2, le domaine JH2. En conséquence de cette mutation JAK2V617F, survient une rigidification de l'hélice alpha C du domaine JH2, favorisant la transphosphorylation du domaine JH1 et l'activation constitutive de JAK2 **(Bandaranayake et al., 2012) (Figure 7)**. JAK2V617F induit donc une activation constitutive, en l'absence de cytokines, des voies de signalisation d'aval telles les voies STAT 1/3/5, MAPK et PI3K. L'activité kinase de JAK2V617F nécessite cependant la présence d'un récepteur homodimérique aux cytokines pour être constitutionnellement active. En effet, il a été montré que JAK2V617F induisait une prolifération indépendante de la présence de facteurs de croissance de cellules hématopoiétiques murines « Ba/F3 », uniquement en association avec la coexpression d'un récepteur homodimérique des cytokines de type 1 (tels que le récepteur de l'EPO, le récepteur de la TPO ou le récepteur du G-CSF).

L'hypothèse est que la présence d'un récepteur est nécessaire pour que deux tyrosines kinase JAK2V617F puissent se fixer à ce récepteur, se rapprocher et s'activer par trans-phosphorylation, même en l'absence d'un ligand au niveau du récepteur **(Lu et al., 2008)**.

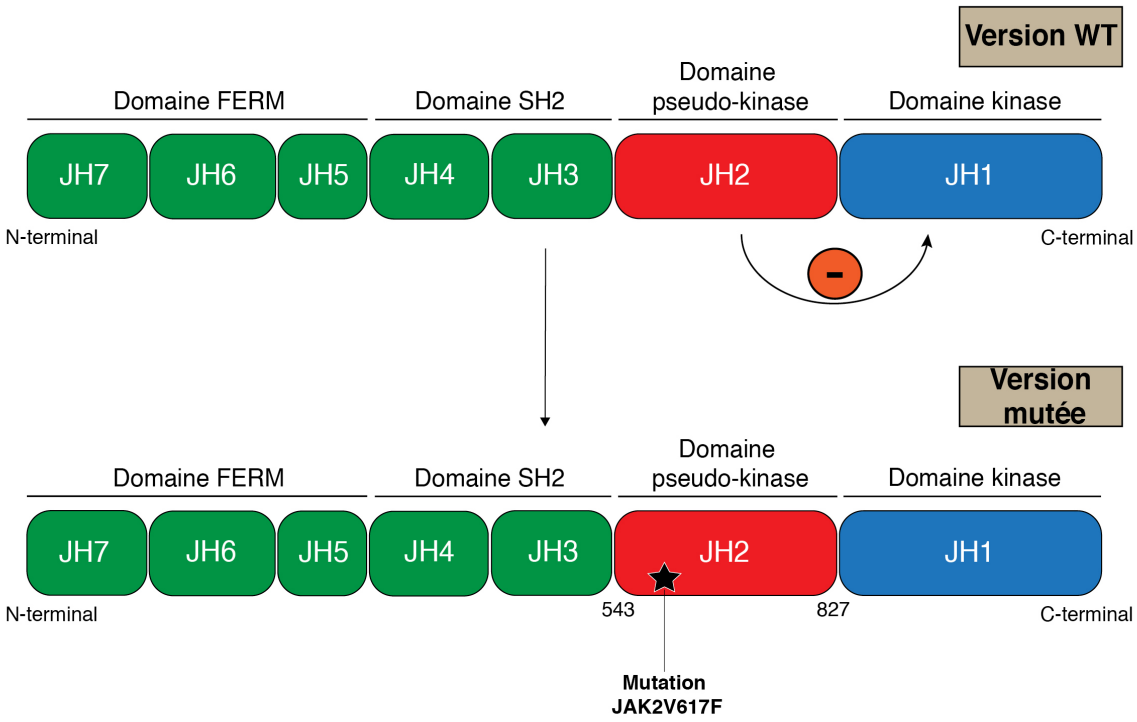


Figure 7 : Mutation V617F de la protéine JAK2

La mutation JAK2V617F survient en position 617 de la protéine JAK2, avec une substitution d'un acide aminé valine en phénylalanine. Cette mutation est située dans le domaine pseudo-kinase JH2, qui inhibe la fonction kinase du domaine JH1. La présence de la mutation V617F induit une diminution d'inhibition du domaine JH2 sur le domaine JH1, et par conséquent une auto-activation constitutive de la protéine kinase JAK2.

L'implication de la mutation JAK2V617F dans la physiopathologie des NMP BCR-ABL- ainsi que son pouvoir oncogénique ont été confirmés à l'aide d'études réalisées *in vivo* dans des modèles murins. Les premiers modèles murins utilisés étaient des modèles rétroviraux dans lesquels des souris étaient greffées avec des cellules hématopoiétiques préalablement transduites avec un rétrovirus apportant la mutation JAK2V617F. Ces souris développent dans un premier temps une polyglobulie évoluant secondairement vers une myélofibrose accompagnée d'une anémie sévère, rappelant ce qui est constaté chez les patients avec PV **(James et al., 2005)(Lacout et al., 2006)(Bumm et al., 2006).** Par la suite, des modèles transgéniques ont été développés permettant de réguler le niveau de JAK2V617F, en fonction du promoteur utilisé pour l'expression de la mutation. Notamment, il a été montré que le ratio entre JAK2V617F et la version endogène WT de JAK2 était déterminante pour le phénotype retrouvé chez la souris : développement d'une maladie de type PV lorsque JAK2V617F est exprimé à des niveaux similaires à ceux de JAK2 endogènes, et maladie de type TE lorsque JAK2V617F est exprimé à des niveaux inférieurs à ceux de JAK2 endogènes **(Tiedt et al., 2008)**. Ces données ont permis de prouver le caractère oncogénique de la mutation JAK2V617F, c'est-à-dire que la présence de la mutation JAK2V617F au sein du compartiment hématopoiétique était suffisante à induire le développement d'une néoplasie myéloprolifération chez la souris. Dans les années qui ont suivi, d'autres modèles murins de *knock-in* JAK2V617F ont été développés permettant de confirmer les résultats précédents et de différencier différents phénotypes en fonction des promoteurs utilisés et des niveaux de JAK2V617F exprimés. Il a notamment été montré que l'expression de JAK2V617F murin à l'état hétérozygote entraînait un phénotype de type PV **(Marty et al., 2010)**, que la présence de JAK2V617F entraînait une amplification des compartiments hématopoiétiques précoces **(Hasan et al., 2013)**, et que l'expression de JAK2V617F humain mimait une TE modérée à l'état hétérozygote et une PV à l'état homozygote **(Li et al., 2014)**. De manière intéressante, ces résultats de modèles murins recoupent ce qui est retrouvé chez les patients. En effet, la plupart des patients atteints de PV ou de MF post-PV ou post-TE portent la mutation à l'état homozygote, tandis que les patients atteints de TE sont le plus souvent hétérozygotes pour la mutation **(Scott et al., 2006)**.

B. La mutation exon 12 de JAK2

Dans les suites de la découverte de la mutation JAK2V617F, il a été constaté que certains patients présentaient des phénotypes évocateurs de PV, sans présence de la mutation JAK2V617F. Il a donc été entrepris de séquencer tous les exons de JAK2 chez ces patients avec

phénotype évocateur de PV mais sans mutation JAK2V617F retrouvée, ce qui a permis de mettre en évidence des mutations gains-de-fonction de JAK2 au niveau de l'exon 12 chez environ 3% des patients JAK2V617F négatif **(Scott et al., 2007)**. Ces mutations ne surviennent pas au niveau du domaine JH2 de JAK2, mais dans une région directement adjacente à celui-ci, entraînant une perturbation de l'inhibition du domaine kinase par le domaine pseudo-kinase. Contrairement à la mutation JAK2V617F provoquée par la substitution d'un seul nucléotide, 37 mutations ont été répertoriées actuellement au niveau de l'exon 12 **(Scott, 2011)**. Ces mutations ont les mêmes conséquences au niveau cellulaire que la mutation JAK2V617F, entraînant une activation constitutive des voies d'aval de JAK2. Sur le plan clinique, les patients avec mutation de l'exon 12 sont diagnostiqués à un âge plus jeune que les patients avec mutation JAK2V617F et présentent des taux d'hémoglobine plus élevés avec des taux de plaquettes et de globules blancs souvent normaux **(Scott, 2011)**.

C. La mutation du gène MPL codant pour le récepteur à la thrombopoïetine

En 2006, a été mise en évidence une nouvelle mutation au cours des NMP BCR-ABL - : une mutation gain-de-fonction de *MPL*, gène codant pour le récepteur à la TPO, située au niveau 515, et appelée MPL W515L **(Pikman et al., 2006)**. D'autres mutations au niveau de *MPL* ont par la suite été rapportées : W515 K/R/A/G/S ou bien S204P et Y591N **(Pardanani et al., 2006a)(Defour et al., 2016)(Cabagnols et al., 2016)**. Toutes entraînent une dimérisation du récepteur MPL, en l'absence de ligand, et son activation constitutive. Ces mutations de MPL sont retrouvées dans 1 à 3% des TE, et 5 à 8% des MFP **(Pardanani et al., 2006b)**. Sur le plan clinique, au cours de la TE, les patients avec mutation MPL W515L/K ont souvent un âge plus élevé, une atteinte micro-circulatoire plus fréquente, des taux d'hémoglobine plus bas et une thrombocytose supérieure par rapport aux patients avec mutation JAK2V617F **(Vannucchi et al., 2008)**. Au cours de la MFP, la présence de la mutation MPL W515L/K entraîne une anémie plus sévère et des besoins transfusionnels plus réguliers par rapport aux patients avec mutation JAK2V617F **(Guglielmelli et al., 2007)**.

D. La mutation du gène codant pour la calréticuline (*CALR*)

En 2013, deux équipes ont mis en évidence de nouvelles mutations au niveau du gène *CALR*, codant pour la calréticuline **(Klampfl et al., 2013)(Nangalia et al., 2013)**. La protéine est une molécule soluble du cytoplasme retrouvée surtout au niveau du réticulum endoplasmique, et dont

la structure comporte 3 domaines (N-P-C) et deux extrémités (N-terminale et C-terminale) **(Figure 8)**. La calréticuline est une molécule chaperonne du réticulum endoplasmique impliquée dans la conformation des protéines et l'homéostasie du calcium. Des mutations de CALR ont été mises en évidence chez environ 25 à 30% des patients avec TE et MFP, et chez plus de 50% des patients avec TE et MFP sans présence de JAK2V617F. Jusqu'à présent, un très grand nombre de mutations ont été mises en évidence au niveau de *CALR* (> 50) mais deux grandes mutations prédominent : *CALRdel52* ou mutation de type I caractérisée par la délétion de 52 paires de bases, et *CALRins5* ou mutation de type II, caractérisée par l'insertion de 5 paires de base. Au cours de la TE, on retrouve un relatif équilibre de la répartition des deux types de mutations : mutation de type I dans 51% des cas, de type II dans 39% des cas. Par contre, au cours de la MFP, la mutation de type I prédomine avec une prévalence de 70%, et 13% concernant la mutation de type II **(Cabagnols et al., 2015)**. Ces mutations entraînent un décalage du cadre de lecture, et la génération d'une nouvelle protéine mutante dotée une nouvelle séquence peptidique C-terminale. Cette nouvelle protéine mutante a la particularité d'avoir une extrémité C-terminale chargée négativement et dépourvue du motif KDEL, motif permettant la rétention de la protéine au niveau du réticulum endoplasmique. De manière intéressante, il a été montré que les protéines mutantes CALRdel52 et CALRins5 activaient le récepteur c-MPL et la voie JAK/STAT, via une interaction entre le domaine d'interaction aux lectines de la protéine CALR et les sites de glycosylation de MPL **(Marty et al., 2016)(Balligand et al., 2016)(Nivarthi et al., 2016)(Araki et al., 2016)(Chachoua et al., 2016)**. Sur le plan clinique, les patients avec mutation *CALR* ont une thrombocytose plus importante, un taux d'hémoglobine et de leucocytes plus bas, ainsi qu'un risque de thrombose plus faible que les patients avec mutation JAK2V617F **(Klampfl et al., 2013)(Tefferi et al., 2014a)**. De plus, les patients avec TE et mutation CALR de type 2 ont une thrombocytose plus importante que les patients avec mutation CALR de type 1 **(Tefferi et al., 2014a)**. Au cours de la MFP, il a été montré que les patients avec mutation CALR de type 1 avaient une survie plus importante que les patients avec mutation CALR de type 2 **(Tefferi et al., 2014b)**.

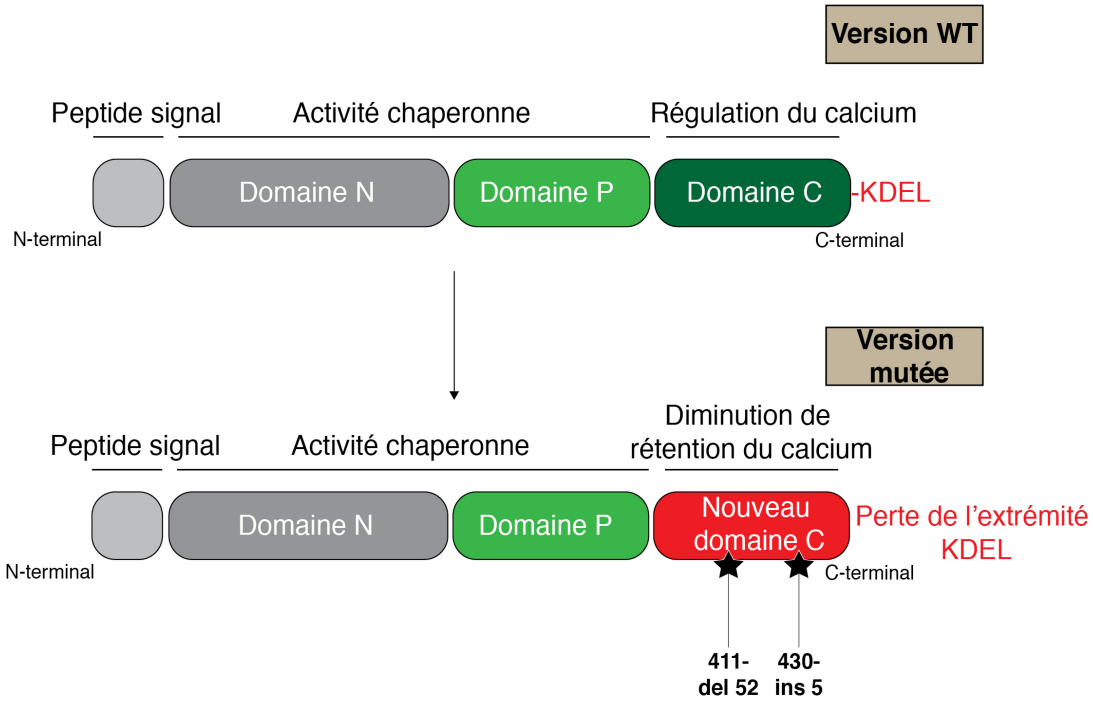


Figure 8 : Mutation de la Calréticuline (CALR) au cours de la thrombocytémie essentielle et de la myélofibrose primitive

La protéine CALR contient un domaine avec activité chaperonne et un domaine responsable de la régulation du calcium. Les mutations CALR surviennent à l'extrémité C-terminal de la protéine, menant à une perte de l'extrémité KDEL et une altération de la fonction régulatrice du calcium.

Figure adaptée de la figure de Vainchenker, Constantinescu et Plo dans l'article « Recent advances in understanding myelofibrosis and essential thrombocytemia », F1000 Research, 2016.

E. Les autres mutations retrouvées au cours des NMP BCR-ABL négatif

En dehors des mutations conductrices retrouvées au cours des NMP décrites ci-dessus, d'autres mutations ont été décrites au cours de ces maladies. D'une part, ces mutations ne sont pas responsables de la myéloprolifération mais peuvent modifier le phénotype de la maladie. D'autre part, ces mutations ne sont pas spécifiques des NMP, car on peut les retrouver dans d'autres maladies hématologiques comme les syndromes myélodysplasiques ou les leucémies aigues. En premier lieu, des mutations au niveau de facteurs de régulation épigénétique ont été décrites : mutations de *TET2* **(Delhommeau et al., 2009)**, de *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH2*, *IDH1/2* **(Lundberg et al., 2014)**. Deuxièmement, des mutations au niveau de gènes de machinerie de l'épissage ont également été rapportées : *SF3B1* ou *SRSF2*. Enfin, certaines mutations ont été retrouvées comme associées à la transformation leucémique : *TP53*, *RUNX1* ou *IKZF1*.

2ème partie : Les complications thrombotiques au cours des NMP BCR-ABL négatif

I. Aspects épidémiologiques

Les thromboses artérielles et veineuses sont les complications les plus fréquentes au cours des NMP BCR-ABL négatif, et sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité importantes. La survenue de thromboses dépend cependant du type de NMP avec un risque allant decrescendo de la PV, vers la TE puis la MFP.

Au cours de la PV, il a été montré que le taux de thrombose avant le diagnostic oscillait entre 23 et 34% tandis que l'incidence au cours du suivi allait de 10 à 20% **(GISP, 1995)(Landolfi et al., 2007)(Barbui et al., 2015a)**. L'étude ECLAP, ayant inclus un nombre majeur de patients, retrouvait par ailleurs une mortalité cardio-vasculaire représentant 41% de la mortalité totale. Cette mortalité cardio-vasculaire était représentée par les coronaropathies (15% des décès), l'insuffisance cardiaque congestive (8% des décès), la survenue d'accidents vasculaires cérébraux (8% des décès) et d'embolies pulmonaires (8% des décès) **(Landolfi et al., 2004).**

Au cours de la TE, le taux de thrombose avant le diagnostic est aux alentours de 20%, tandis qu'au cours du suivi, l'incidence de survenue de thrombose est d'environ 10% **(Carobbio et al., 2011)(Montanaro et al., 2014)**. Le statut mutationnel est important à prendre compte pour le risque thrombotique avec un risque plus élevé en cas de mutation JAK2V617F par rapport à la présence d'une mutation MPL, et par rapport à la présence d'une mutation CALR. Ainsi, l'étude de Klampfl et al. a montré que le taux de thrombose à 10 ans chez les patients avec TE JAK2V617F positif était de 21%, tandis que celui retrouvé chez les patients avec mutation CALR était de 11% **(Klampfl et al., 2013)**. Les études de Rotunno et al. **(Rotunno et al., 2014)**, Palandri et al. **(Palandri et al., 2015)** et Bertozzi et al. **(Bertozzi et al., 2016a)** ont confirmé ces résultats avec des taux de thrombose chez les patients avec TE CALR allant de 3,5 à 14,9% contre 11 à 20,6% chez les patients avec TE JAK2V617F.

Au cours de la MFP, la survenue d'évènements thrombotiques semble moins importante, même si l'étude de l'incidence est rendue compliquée par des facteurs confondants comme la transformation volontiers plus précoce en leucémie aiguë ou la survenue d'un décès précoce **(Barbui et al., 2010)**. Avant le diagnostic, le taux de thrombose est d'environ 7%, tandis que l'incidence au cours du suivi est d'environ 10% **(Cervantes et al., 2006)(Barbui et al., 2010)(Barosi et al., 2012)**.

Dans toutes les NMP, le risque thrombotique est prédominant dans le territoire artériel par rapport au territoire veineux, que ce soit concernant les thromboses survenues avant le diagnostic ou bien les thromboses survenant au cours du suivi. Ainsi, au cours de la PV et de la TE, l'atteinte thrombotique est artérielle dans environ 70% des cas **(Policitemia (gisp), 1997)(Landolfi et al., 2007)(Barbui et al., 2015a)(Montanaro et al., 2014)(Carobbio et al., 2011)**. Au cours de la MFP, ce taux semble plus faible (20%) même si le nombre d'études l'ayant analysé est plus restreint **(Barbui et al., 2010)(Barosi et al., 2012)**.

En dehors des thromboses des gros vaisseaux artériels ou veineux, les patients avec NMP BCR-ABL négatif rapportent souvent des troubles secondaires à des atteintes de la micro-circulation : céphalées, vertiges, acouphènes, paresthésies, érythermalgies **(Elliott and Tefferi, 2004)**.

Une particularité importante à souligner est la survenue de thromboses dans des territoires inhabituels au cours de ces maladies avec notamment la survenue de thromboses dans le territoire splanchnique, de thromboses veineuses cérébrales ou d'occlusions de la veine centrale de la rétine. A propos des thromboses splanchniques, il a été montré qu'une thrombose splanchnique survenait chez 0,3 à 7,8% des patients avec PV et 1 à 7,3% des patients avec TE **(Sekhar et al., 2013)**. A l'inverse, une méta-analyse récente a montré que 40% des patients avec syndrome de Budd-Chiari (thrombose de la veine cave inférieure et/ou de(s) veine(s) sus-hépatique(s)) et 30% des patients avec thrombose de la veine porte avaient une NMP **(Smalberg et al., 2012)**, et que la mutation JAK2V617F était retrouvée sans présence d'une NMP associée dans 17% des syndromes de Budd-Chiari et 15% des thromboses portes. Ces données soulignent l'intérêt et la nécessité de rechercher la présence d'une mutation JAK2V617F et une NMP en cas de survenue de thrombose du territoire splanchnique. La présence d'une mutation *CALR* au cours de ces thromboses est bien plus rare (1% des cas) **(Sekhar et al.)(Ho and Hong, 2017)(Turon et al., 2015)** et sa recherche doit être probablement limitée en cas de critères évoquant une TE et/ou une MFP (thrombocytose, splénomégalie) **(Poisson et al., 2017)**. Enfin, la présence d'une mutation de MPL **(Iurlo et al., 2015)(Bergamaschi et al., 2008)** ou de l'exon 12 de JAK2 **(Jadli et al., 2012)(Fiorini et al., 2008)** est également rare (3% des cas) et leur recherche ne doit pas être faite en première ni seconde intention dans ces situations. A propos des thromboses veineuses cérébrales, il est à noter que la recherche de la mutation JAK2V617F peut être intéressante. En effet, l'identification de la mutation JAK2V617F a été retrouvée dans 0 **(Colaizzo et al., 2007)**, 4,8% **(Stefano et al., 2007)** ou 6,6% **(Passamonti et al., 2012)** des cas, avec un taux de 4,5% de positivité dans les 11 séries de patients publiés **(Ianotto, Thèse de sciences, 2017)**. La survenue de thromboses dans ces sites inhabituels souligne la

physiopathologie particulière, complexe, et partiellement méconnue des mécanismes de survenue de thrombose au cours des NMP BCR-ABL-.

II. Rappels sur la physiopathologie de la thrombose

A. Rappels sur l'hémostase physiologique

L'hémostase est le processus biologique permettant la restauration de l'intégrité vasculaire et l'arrêt du saignement survenant lors d'une blessure du vaisseau. Ce processus aboutit à la formation d'un caillot de fibrine et implique deux grands acteurs : les plaquettes et le système de la coagulation qui permet la génération de fibrine ; fibrine qui constitue un réseau enserrant les plaquettes, mais également les globules rouges et les leucocytes **(Figure 9)**.

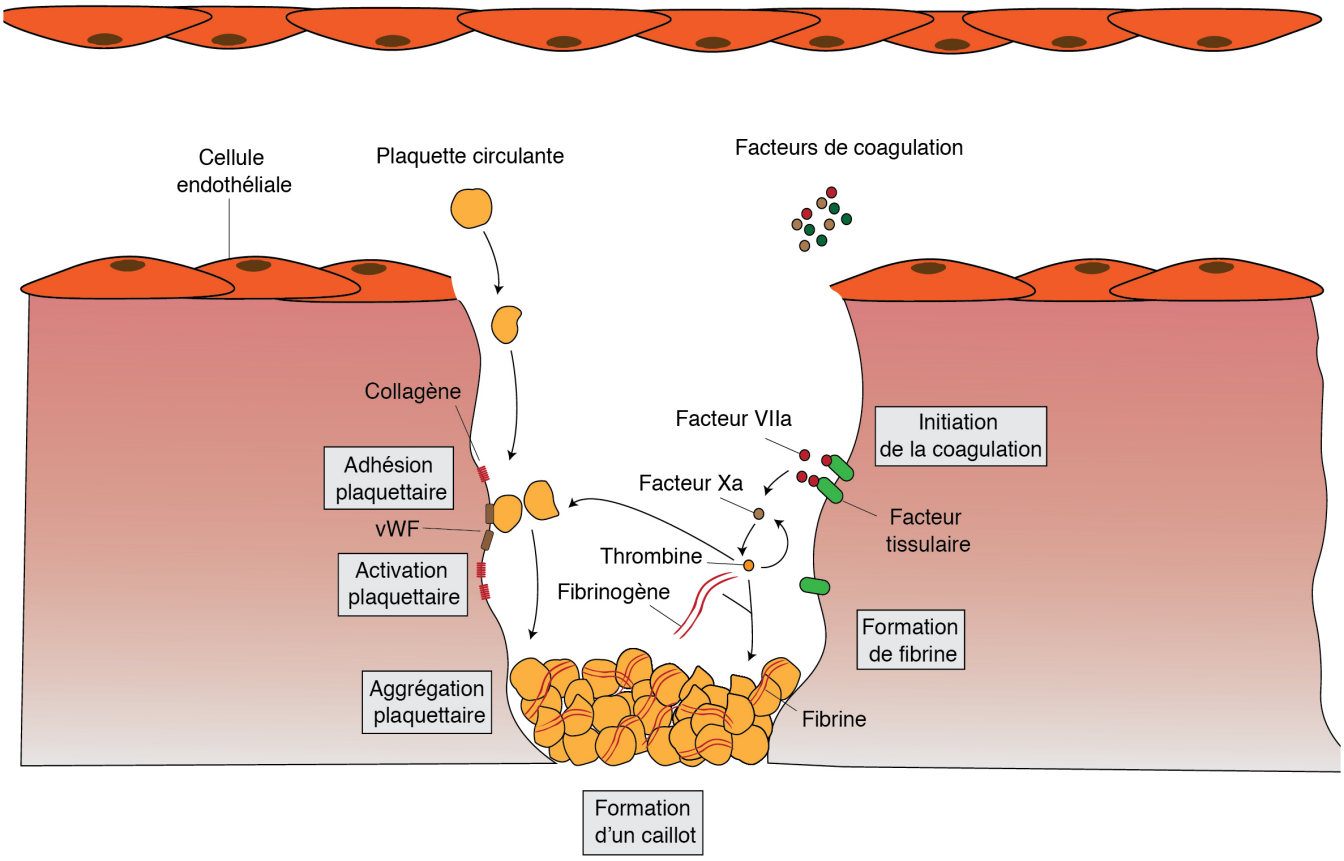


Figure 9 : Schéma de l'hémostase humaine
En cas d'atteinte de l'intégrité du vaisseau, les plaquettes sont recrutées au niveau du site de l'atteinte et vont adhérer au sous-endothélium exposé via l'interaction entre des récepteurs de surface et des protéines du sous-endothélium : interaction entre la glycoprotéine (Gp) Ib-IX-V et le facteur vWF, la GpIIb-IIIa et le facteur vWF, la Gp VI et le collagène, des intégrines avec la fibronectine et la laminine (non figurées sur le schéma). L'adhésion des plaquettes mène à leur activation puis à leur agrégation. La formation du clou plaquettaire constitue la première étape de l'hémostase, dite hémostase primaire. Le clou plaquettaire est ensuite stabilisé par la fibrine, générée après activation de la cascade de la

coagulation, via l'exposition du facteur tissulaire puis l'activation du facteur VII, du facteur X et la génération de thrombine.
Figure adaptée de la figure de Engelmann et Massberg dans l'article « Thrombosis as an intravascular effector of immunity », Nature Review Immunology, 2013.

a. Implication des plaquettes

Les plaquettes sont de petites cellules anucléées générées à partir des mégacaryocytes au niveau de la moelle osseuse, et vraisemblablement également au niveau pulmonaire **(Lefrançais et al., 2017)**. Des millions de plaquettes sont produites chaque jour, circulant au niveau périphérique, et jouant un rôle de sentinelles en cas d'atteinte vasculaire. Lorsque l'intégrité du vaisseau est altérée, les plaquettes sont recrutées au niveau du site de l'atteinte et vont adhérer au sous-endothélium exposé via l'interaction entre des récepteurs de surface et des protéines du sous-endothélium : interaction entre la glycoprotéine (Gp) Ib-IX-V et le facteur vWF, la GpIIb-IIIa et le facteur vWF, la Gp VI et le collagène, des intégrines avec la fibronectine et la laminine. L'adhésion des plaquettes va entraîner leur activation, tout comme la présence locale d'agonistes solubles (ADP, vasopressine, sérotonine, thrombine, épinéphrine). L'adhésion plaquettaire peut également se faire en l'absence d'exposition du sous-endothélium via la voie du facteur tissulaire (FT), et de manière indépendante de la GpVI et du facteur vWF. Dans cette voie, le FT forme un complexe avec le facteur VIIa, initiant la cascade de la coagulation, et aboutissant à la génération de thrombine. La thrombine clive le récepteur PAR-1 présent à la surface des plaquettes, provoquant une activation des plaquettes. Cette activation va se traduire premièrement par une contraction plaquettaire, caractérisée par une sphérisation de la cellule, une émission de pseudopodes ainsi qu'une réorganisation du cytosquelette. Deuxièmement, l'activation plaquettaire va mener à la dégranulation plaquettaire avec sécrétion de molécules solubles jouant un rôle autocrine et paracrine : ADP, sérotonine, thromboxane A2. Enfin, l'activation entraîne un changement de conformation de la Gp IIb-IIIa, augmentant l'affinité de cette glycoprotéine pour ses ligands, le fibrinogène et le facteur vWF. L'interaction entre la Gp IIb-IIIa de haute affinité et le fibrinogène d'une part, et entre la Gp IIb-IIIa et le facteur vWF d'autre part, va permettre la formation de ponts inter-plaquettaires et donc l'agrégation des plaquettes entre elles et avec le sous-endothélium. La formation d'un caillot plaquettaire constitue la première étape de l'hémostase, dite hémostase primaire. En parallèle de l'activation plaquettaire, va se mettre en place la cascade de la coagulation, qui va permettre un renforcement ainsi qu'une stabilisation du caillot déjà formé. En dehors de la formation d'un caillot plaquettaire, les plaquettes jouent également un rôle majeur dans cette cascade de la coagulation, en constituant une surface d'activation des facteurs de la coagulation, lorsqu'après activation et retournement de la

membrane plasmique (phénomène de flip-flop), elles expriment à leur surface des phospholipides indispensables aux réactions de la cascade de la coagulation.

b. Rôle de la cascade de la coagulation

Le facteur tissulaire (FT) est exprimé de manière constitutive au niveau des fibroblastes et péricytes de l'adventice de la paroi vasculaire. Le FT est également exprimé à la surface des cellules endothéliales activées, des monocytes, et des microparticules circulantes. Même si le FT est exprimé à la surface de cellules sanguines circulantes au cours de certains processus pathologiques, l'endothélium est pensé comme une barrière entre le FT présent au niveau de la paroi vasculaire et le facteur VII présent dans le sang circulant, de manière à prévenir l'initiation de la coagulation en l'absence de blessure vasculaire. L'initiation de la cascade de la coagulation se déclenche à partir de l'exposition du FT, sous forme activée. Le FT peut également être activé par une enzyme, la protéine disulfide isomérase (PDI), sécrétée par les plaquettes et les cellules endothéliales **(Cho et al., 2008)**. Le FT va se lier au facteur VII, permettant la génération du complexe FT-FVIIa. Ce complexe a trois substrats, le facteur VII, le facteur IX et le facteur X, qui vont être activés. Le facteur IXa va se lier au facteur VIII pour générer le complexe tenase (FIXa-FVIII), qui va à son tour également activer le facteur X. Le facteur Xa, généré via le complexe FIXa-FVIII ou le complexe FT-FVIIa, va se lier au facteur V, pour former le complexe prothrombinase, entraînant la formation de thrombine à partir de pro-thrombine. Au cours de cette première phase, le taux de génération de thrombine en présence de facteur V non activé est extrêmement faible, inférieure à 1% du taux de génération de thrombine en présence de facteur Va **(Nesheim et al., 1979)(Orfeo et al., 2004)**. De même, le facteur VIII, en forme non activée, entraîne la génération d'un complexe tenase (FIXa-FVIII) de faible efficacité. Une fois formée en faibles quantités, la thrombine va convertir le facteur V en facteur V activé, et le facteur VIII en facteur VIII activé. Les complexes tenase (FIXa-FVIIIa) et prothrombinase (FXa-FVa) vont alors agir de manière pleinement efficace et générer de larges quantités de thrombine : c'est la phase d'amplification de la cascade de la coagulation. La thrombine va également activer le facteur XIa, participant à l'amplification de la voie endogène de la coagulation. Une fois formée, la thrombine convertit le fibrinogène en fibrine, permettant une augmentation de la stabilité du thrombus et la formation d'un thrombus constitué. L'activation du facteur VII par le facteur tissulaire constitue le départ de la voie dite extrinsèque de la coagulation. La voie intrinsèque ou endogène joue également un rôle au cours de la cascade de la coagulation : cette voie est une voie d'amplification mais ne participe pas à l'initiation de la coagulation in vivo **(Furie and Furie, 1992)**. Elle est déclenchée par la liaison du kininogène de haut poids

moléculaire (KHPM) et du facteur XII à des surfaces chargées négativement, et notamment les phospholipides présents à la surface des plaquettes. Au cours de son activation, le facteur XII est converti en facteur XII activé, qui à son tour active le facteur XI en facteur XI activé, qui active le facteur IX en facteur IX activé. Le facteur IXa va se lier au facteur VIIIa, le complexe FIXa-VIIIa activant le facteur X **(Figure 10)**.

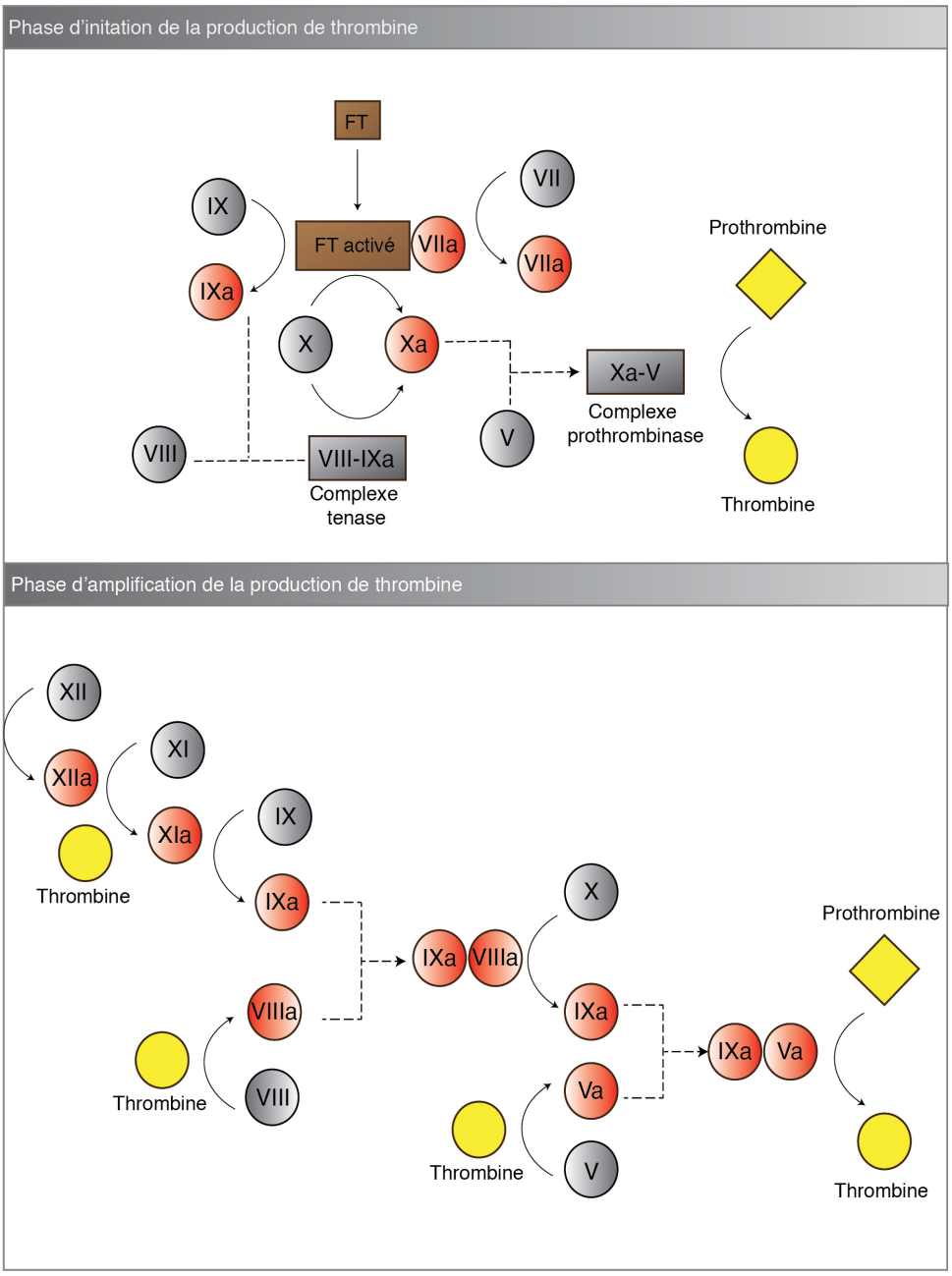


Figure 10 : Schéma de la cascade de la coagulation

L'initiation de la cascade de la coagulation se déclenche à partir de l'exposition du FT, sous forme activée. Le FT va se lier au facteur VII, permettant la génération du complexe FT-FVIIa. Ce complexe a trois substrats, le facteur VII, le facteur IX et le facteur X, qui vont être activés. Le facteur IXa va se lier au facteur VIII pour générer le complexe tenase (FIXa-FVIII), qui va à son tour également activer le facteur X. Le facteur Xa, généré via le complexe FIXa-FVIII ou le complexe FT-FVIIa, va se lier au facteur V, pour former le complexe prothrombinase, entraînant la formation de thrombine à partir de pro-thrombine.

Une fois formée en faibles quantités, la thrombine va convertir le facteur V en facteur V activé, et le facteur VIII en facteur VIII activé. Les complexes tenase (FIXa-FVIIIa) et prothrombinase (FXa-FVa) vont alors agir de manière pleinement efficace et générer de larges quantités de thrombine : c'est la phase d'amplification de la cascade de la coagulation.
Figure adaptée de la figure de Barbara Furie et Bruce Furie dans l'article « Mechanism of thrombus formation ».

c. ***Régulation des mécanismes d'hémostase***

Afin qu'il n'y ait pas de génération de thrombine et de fibrine à distance du site de blessure vasculaire, des mécanismes de régulation de la cascade de la coagulation existent. L'anti-thrombine joue un rôle en inhibant la thrombine, mais également en inhibant le complexe prothrombinase et le facteur XIa. La thrombine est également captée à la surface des cellules endothéliales par la thrombomoduline (TM). Le complexe thrombine/thrombomoduline active la protéine C (PC) en protéine C activée (PCa). La PCa va se lier à son cofacteur, la protéine S (PS), permettant une inhibition du facteur Va et du facteur VIIa. Enfin, le *tissue factor pathway inhibitor* (TFPI), synthétisé par les cellules endothéliales, se lie au complexe FT-FVIIa afin d'inhiber la génération de facteur Xa.

Enfin, des mécanismes d'élimination du thrombus existent, via la dégradation de la fibrine au cours de la fibrinolyse. Des molécules activatrices de la fibrinolyse existent, qui exercent leur action via la transformation du plasminogène en plasmine : ce sont l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) et l'urokinase (u-PA). La plasmine permet ensuite la dégradation de la fibrine. A l'inverse, des molécules inhibitrices vont exercer une action anti-fibrinolyse : ce sont l'alpha-2-antiplasmine, inhibiteur spécifique de la plasmine, et l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène de type 1 ou PAI-1.

B. Rappels sur les mécanismes de la thrombose artérielle et veineuse

a. *Mécanismes de thrombose artérielle*

La thrombose artérielle survient le plus souvent en présence d'une athérosclérose sous-jacente, et peut être considérée comme une « poussée » inflammatoire dans le cadre d'une maladie inflammatoire artérielle chronique.

1) *Survenue d'une lésion d'athérosclérose*

La survenue d'une lésion d'athérosclérose est déclenchée par une agression endothéliale et l'accumulation de liprotéines de faible densité (low-density lipoproteins ou LDL) et de dérivés

réactifs de l'oxygène (ROS) au sein de la paroi artérielle, LDL soumis ultérieurement à oxydation et modification. A l'état basal, l'endothélium exerce un effet « anti-adhésif » via différentes voies : expression d'ecto-ADP-ase inhibant l'ADP, sécrétion d'oxyde nitrique (NO) et de prostaglandine I2 (PGI2) inhibant l'activation plaquettaire, expression de thrombomoduline (TM) et du récépteur EPCR (endothelial protein-C receptor) permettant l'activation de la protéine C en protéine C activée. La présence de ces différents composants à l'état basal permet une inhibition de l'activation plaquettaire et de la génération de thrombine. En présence d'agression endothéliale médiée par un environnement inflammatoire et par l'incorporation de LDL et de dérivés réactifs de l'oxygène au sein de la paroi artérielle, les cellules endothéliales activées vont exprimer à leur surface différentes molécules d'adhésion : facteur von Willebrand (vWF), VCAM-1, ICAM-1, P-et E-Selectine. L'expression de P-Sélectine et de vWF permet l'attachement et le « rolling » des plaquettes à la surface des CE. L'expression de ICAM-1 et VCAM-1 permet l'attachement des monocytes circulants. Les monocytes attachés vont dans un second temps migrer à travers l'endothélium, se différencier en macrophages sous la dépendance du facteur de croissance M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), et incorporer les LDL oxydés présents au niveau sous-endothélial. L'accumulation de LDL au sein des macrophages va conduire à la formation de cellules spumeuses au niveau de l'intima. En cas de développement chronique de la plaque d'athérosclérose, vont se déposer au niveau de l'intima, des fibres de collagène, participant à la stabilisation de la plaque d'athérosclérose. Une évolution rapide de la plaque ainsi formée peut survenir, entraînant une instabilité de la plaque : développement d'un centre nécrotique, augmentation de volume de la plaque et amincissement du dépôt de collagène. Une érosion ou une fissuration de la plaque va alors entraîner une mise en contact du sous-endothélium avec le flux sanguin, menant au développement d'un thrombus. Le plus souvent, ce n'est pas un seul évènement de rupture de plaque qui va mener à un thrombus occlusif, mais l'accumulation de phénomènes de ruptures et de réparations de plaque. Cet enchaînement de ruptures et de réparations va entraîner une sténose du vaisseau atteint ainsi qu'une augmentation du flux sanguin à son niveau participant également à la progression de la plaque et à la majoration de la sténose.

2) Evènements cellulaires menant à la thrombose artérielle

Comme lors de l'hémostase physiologique, lorsque le sous-endothélium est mis en contact avec le flux sanguin, les protéines de matrice sont alors exposées : facteur von Willebrand, fibres de collagène, fibronectine, laminine. L'exposition de ces protéines du sous-endothélium va mener à l'adhésion plaquettaire via différentes voies : liaison du vWF au

complexe GPIb-V-IX, liaison du collagène à la GPVI et à l'intégrine alpha-2-beta-1, liaison de la fibronectine à l'intégrine alpha-5-beta-1. L'adhésion des plaquettes va entraîner leur activation, puis la formation de liaisons inter-plaquettaires. Cette première étape aboutit à la constitution d'un thrombus riche en plaquettes ou « thrombus blanc ». A partir de la première étape de liason et d'activation plaquettaire, va se mettre en place une activation des voies de la coagulation. En effet, la surface des plaquettes activées, riche en phospholipides, constitue une surface d'assemblage des principaux complexes de la coagulation. Cette activation de la coagulation va aboutir à la formation de fibrine et de thrombine et à la mise en place d'un thrombus riche en fibrine et en globules rouges. Enfin, les leucocytes circulants vont se lier aux plaquettes déjà fixées sur l'endothélium. Notamment, les neutrophiles circulants sont recrutés au niveau de la lésion, relarguent des protéines granulaires (azurocidine, cathepsine G), participant également à l'activation de l'endothélium. Une description plus détaillée du rôle des PNN dans la thrombose artérielle est effectuée dans la suite de la thèse.

En conclusion, la survenue d'une thrombose artérielle est un processus complexe, faisant intervenir de nombreux composants cellulaires, au cours d'un processus inflammatoire chronique de la paroi artérielle. Le compartiment endothélial constitue un des piliers majeurs de cette physiopathologie. En effet, son activation mène au recrutement cellulaire et à l'initiation du développement du thrombus. De plus en plus étudiés, les PNN participent également de cette physiopathologie, via notamment leur recrutement au niveau des plaquettes et l'activation endothéliale qu'ils entraînent **(Figure 11)**.

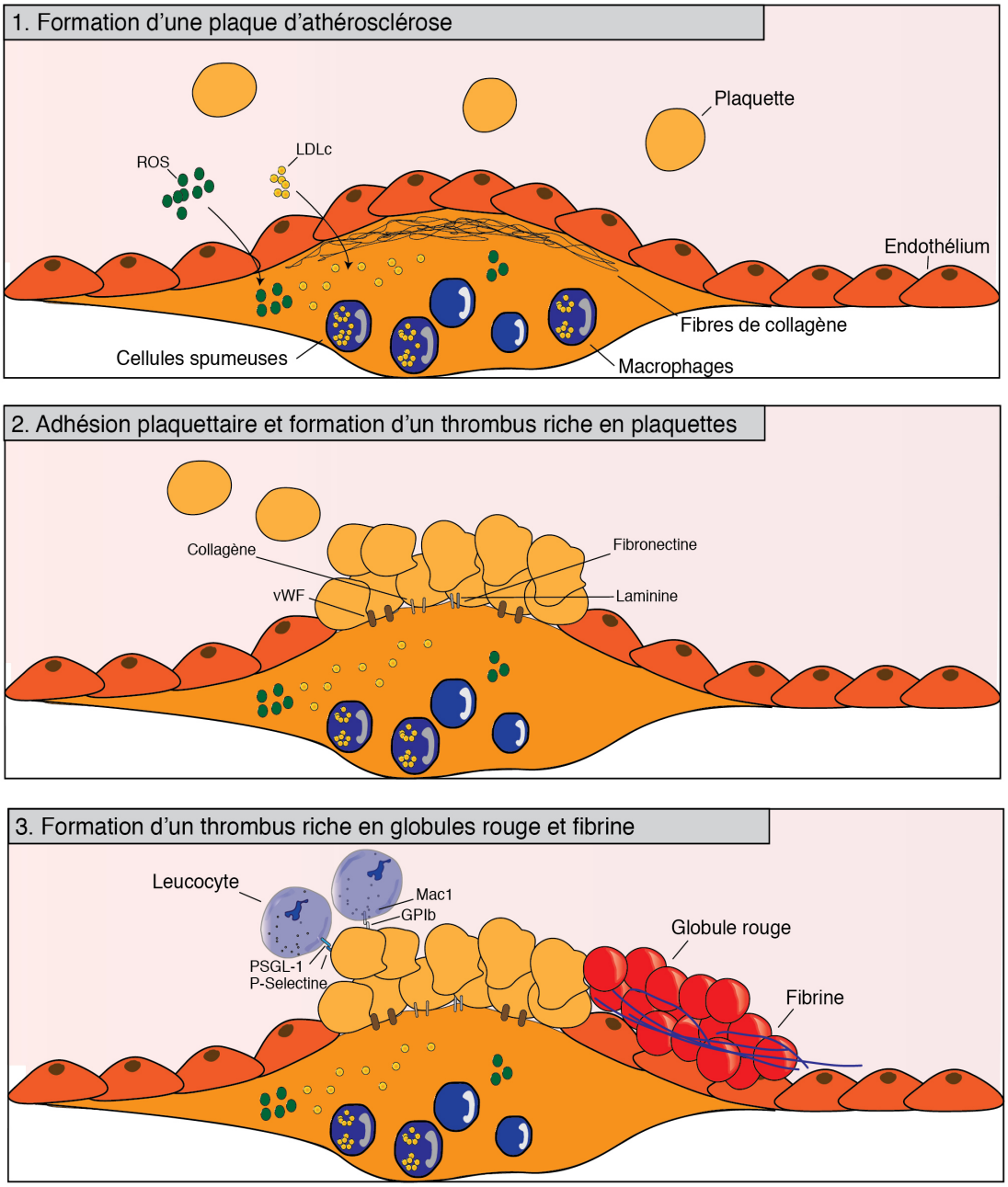


Figure 11 : Schéma des mécanismes participant à la survenue de thrombose artérielle

1. *Les dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygene species, ROS) et les lipoprotéines de faible densité (LDLc) s'accumulent au niveau du sous-endothélium, aboutissant à une activation des cellules endothéliales (CE). Dans un second temps, les monocytes migrent au niveau de l'intima, se différencient en macrophages qui intègrent les LDL, et deviennent des cellules spumeuses. Ce processus aboutit à la formation d'une plaque d'athérosclérose qui évolue le plus souvent de façon chronique.*

2. *Lors de la rupture de la plaque, les protéines d'adhésion du sous-endothélium sont mises en contact avec le flux sanguin. Les plaquettes adhérent au sous-endothélium, sont activées puis adhèrent entre elles, aboutissant à la formation d'un thrombus riche en plaquettes.*

3. *L'activation des voies de la coagulation ainsi que le recrutement de leucocytes au site de thrombose aboutissent à la formation d'un thrombus riche en fibrine et en globules rouges.*

b. Mécanismes de thrombose veineuse

La thrombose veineuse survient en absence de mise à nu de l'endothélium. La première étape de la formation d'un thrombus veineux est l'activation du compartiment endothélial, médiée par la diminution du débit sanguin et la stase sanguine. L'hypoxie entraîne également une activation endothéliale **(Pinsky et al., 1996)**. Comme dit plus haut, le compartiment endothélial exerce une activité « anti-coagulante » via différents mécanismes : expression de TM, d'ecto-ADP-ase, sécrétion de NO et de PGI2, expression de protéoglycanes **(Esmon and Esmon, 2011) (Figure 12)**.

Activées, les cellules endothéliales vont exprimer à leur surface la P-Sélectine qui va lier les leucocytes via le couple P-Selectine/PSGL1. Cette liaison des leucocytes, monocytes et PNN, aux cellules endothéliales, constitue une étape cruciale de la physiopathologie de la thrombose veineuse. Les plaquettes sont également recrutées au niveau de l'endothélium, via la liaison de la GPIb au facteur von Willebrand exprimé à la surface des cellules endothéliales, mais surtout via leur liaison aux leucocytes déjà recrutés (von Brühl et al., 2012)**.** Suite à l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, la coagulation est activée via différents mécanismes : activation du facteur XII par les neutrophil extracellular traps (NET) émis par les PNN, activation de la voie extrinsèque par le facteur tissulaire exprimé au niveau des monocytes, des PNN et des micro-vésicules circulantes, inhibition de protéines anticoagulantes par les NET **(Massberg et al., 2010)**. Les plaquettes recrutées au niveau des leucocytes vont également activer ceux-ci, favorisant l'émission de NET, et participant à la mise en place d'un « cercle vicieux » qui va concourir à la mise en place du thrombus **(von Brühl et al., 2012) (Figure 13)**.

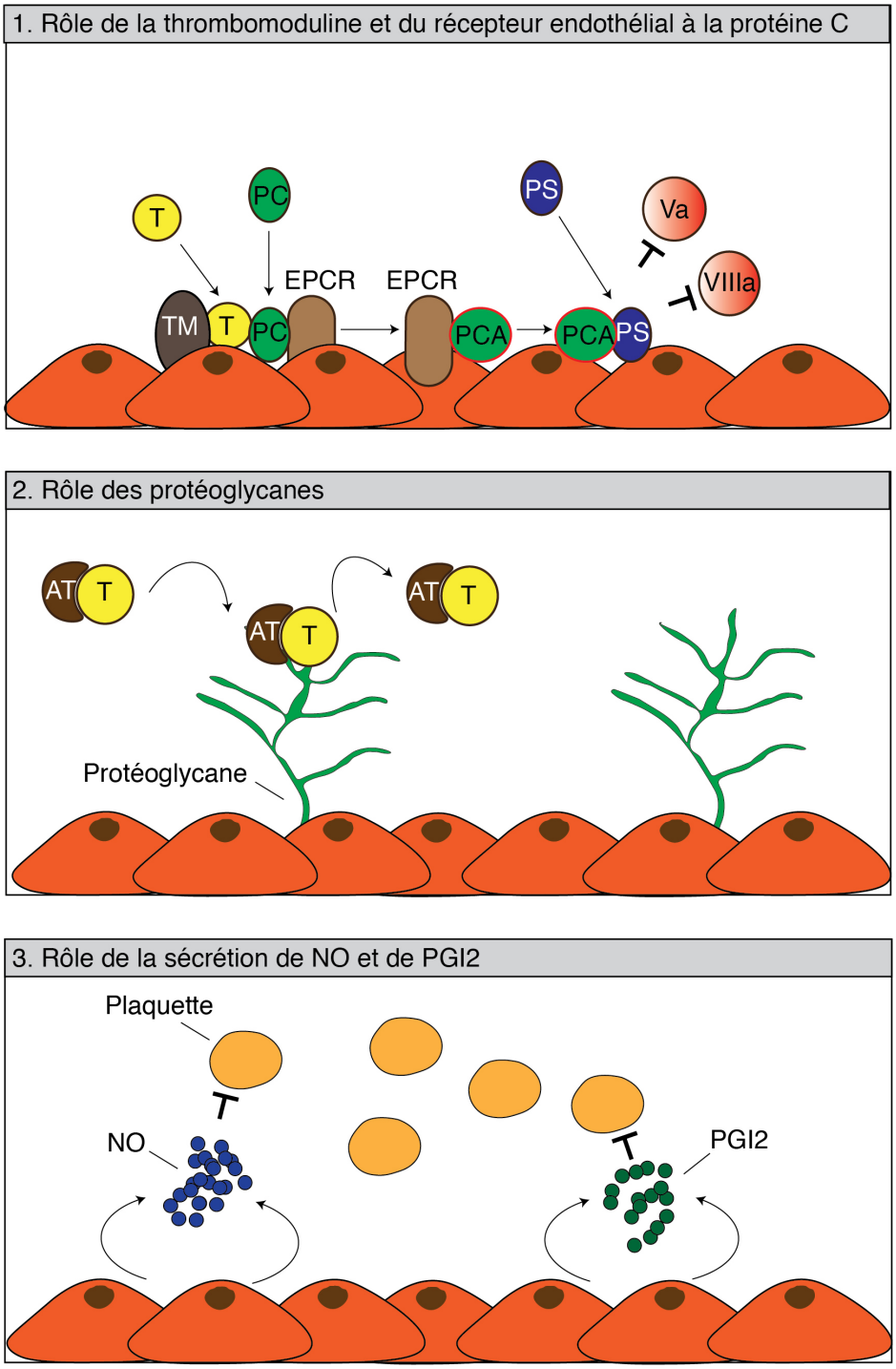


Figure 12 : Rôle anticoagulant du compartiment endothélial

1. *La thrombine se lie à la thrombomoduline (TM) qui inhibe sa capacité à activer le fibrinogène et les plaquettes, et lui permet d'activer la protéine C (PC) en protéine C activée (PCA). L'activation de la PC est potentialisée par le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR), qui protège également la PCA de la dégradation. La PCA est dissociée de l'EPCR et intéragit avec la protéine S (PS) afin de catalyser l'inactivation des facteurs Va et VIIIa.*

2. *L'anti-thrombine (AT) se fixe à la thrombine (T) et à d'autres facteurs (IXa and Xa) afin de les inhiber. La liaison de l'AT aux protéoglycanes liés à l'endothélium accélère la réaction d'inhibition de la thrombine par l'AT.*

3. *Les cellules endothéliales sécrétent de l'oxyde nitrique (NO) et de la prostaglandine I2 (PGI2) qui inhibent les plaquettes circulantes.*

Figure adaptée de la figure de Esmond C. et Esmond N. dans l'article « The link between vascular features and thrombosis » dans Annual Reviews of Physiology, 2011.

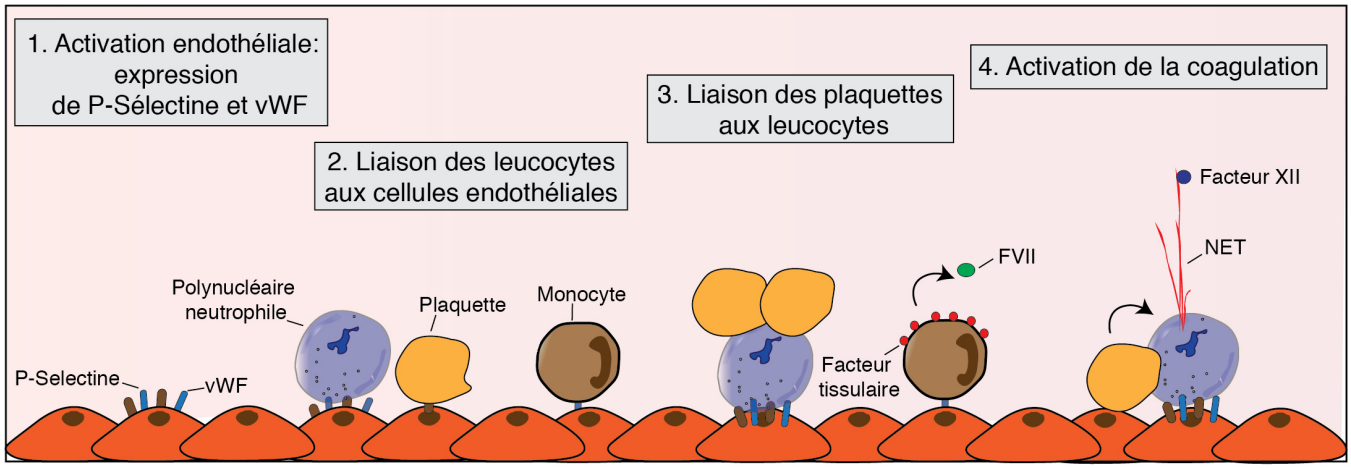


Figure 13 : Schéma des mécanismes participant à la survenue de thrombose veineuse

En cas de stase sanguine, de réduction du flux sanguin ou d'hypoxie, les cellules endothéliales (CE) sont activées et expriment à la surface de la P-Sélectine et du facteur Willebrand (vWF). Les leucocytes, monocytes et polynucléaires neutrophiles (PNN) se lient aux CE via la P-Sélectine et sont les premières cellules recrutées au site de thrombose. Dans un second temps, les plaquettes se lient aux leucocytes. L'activation de la voie extrinsèque de la coagulation est médiée par l'expression de facteur tissulaire (FT) par les monocytes, les PNN, et les microvésicules (MV) circulantes. L'activation de la voie intrinsèque de la coagulation est médiée par l'activation du facteur XII par les neutrophil extracellular trap (NET). Les plaquettes activent les PNN, qui relarguent des NET. Les NET activent les CE et les plaquettes.

Figure adaptée de la figure de Mackman N. dans l'article « New insights in mechanisms of venous thrombosis », The Journal of Clinical Investigation, 2012.

III. Facteurs de risque et physiopathologie de la thrombose dans les NMP BCR-ABL négatif

La physiopathologie de la thrombose au cours des NMP BCR-ABL – est complexe. Des facteurs cliniques (âge, antécédents de thrombose, facteurs de risque cardio-vasculaires), des taux élevés de cellules sanguines (leucocytose, thrombocytose, érythrocytose) participent à cette physiopathologie. Mais, surajoutées aux modifications quantitatives des cellules sanguines circulantes, entrent également en jeu des anomalies qualitatives de ces cellules avec une activation accrue, la présence augmentée de facteurs plasmatiques « pro-coagulants » et des altérations du flux sanguin notamment en cas d'hématocrite élevé comme rencontré lors de la PV. Enfin, l'endothélium joue également probablement un rôle dans la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP. La Figure 17 récapitule ce qui était connu, au début de ce travail de thèse, sur la physiopathologie de la thrombose dans les NMP. **(Figure 14)**.

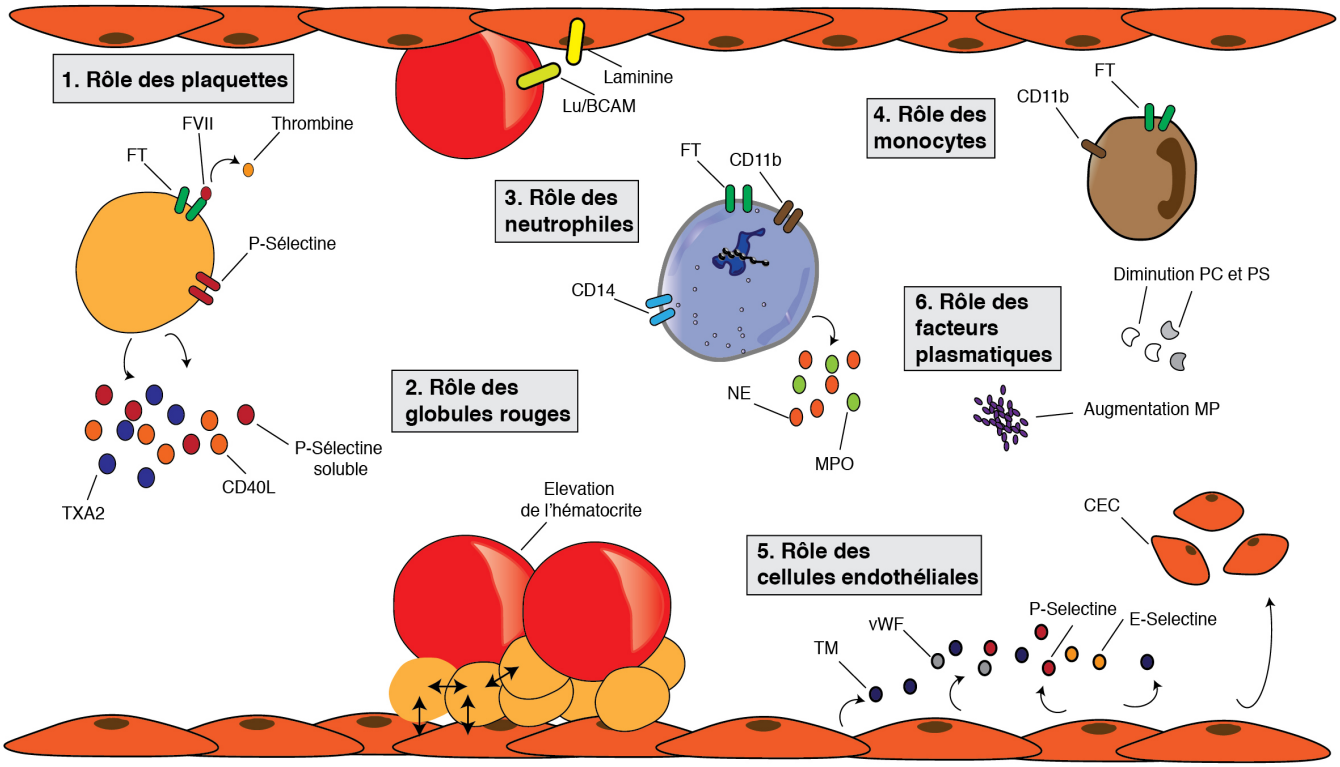


Figure 14 : Physiopathologie de la thrombose au cours des néoplasies myéloprolifératives (NMP) avec mutation JAK2V617F

Différents compartiments cellulaires sont impliqués dans la physiopathologie de la thrombose des NMP JAK2V617F. Il a été montré que les plaquettes étaient activées chez les patients avec NMP, avec augmentation d'expression à leur surface de facteur tissulaire (FT), de P-Sélectine. Dans le plasma de patients avec NMP, des taux augmentés de thromboxane A2 (TXA2), CD40 ligand et P-Selectine soluble ont été mis en évidence. Les globules rouges jouent également un rôle : en cas d'augmentation de l'hématocrite, ils entraînent un déplacement des plaquettes au contact de l'endothélium, et ces cellules sont également activées (surexpression de Lu/BCAM). Il a été montré que les polynucléaires neutrophiles et les monocytes étaient activés : augmentation à leur surface d'expression de facteur tissulaire, CD11b, augmentation des taux plasmatiques d'élastase neutrophile (NE) et de myélopéroxydase (MPO). Les cellules endothéliales sont activées avec, chez les patients, augmentation de marqueurs plasmatiques d'activation endothéliale : thrombomoduline (TM), facteur von Willebrand (vWF), P- et E-Selectine, et augmentation du taux de cellules endothéliales circulantes (CEC). Enfin, des facteurs plasmatiques jouent certainement un rôle dans cette physiopathologie avec augmentation du taux de microparticules (MP), diminution des taux de protéine C et protéine S, présence plus fréquente d'une résistance à la protéine C activée.

A. Age et antécédent de thrombose

Le premier facteur de risque de thrombose reconnu au cours des NMP est l'âge supérieur ou égal à 60 ans. Au cours de la TE, une des plus larges séries réalisées a inclus 891 patients et retrouvait un hazard-ratio (HR) à 1,50 (IC : 1,0-2,25, p= 0,049) d'avoir un évènement thrombotique chez les patients de plus de 60 ans **(Carobbio et al., 2011)**. Une autre étude montrait que le taux de thrombose chez les patients de plus de 60 ans était de 15,1/100 patients/an, contre 6,3/100 patients/an chez les patients âgés de 40 à 60 ans, et 1,8/100 patients/an chez les patients de moins de 40 ans **(Cortelazzo et al., 1990)**. Au cours de la PV, l'étude du GISP en 1995, réalisée sur 1213 patients, montrait que le taux global de thrombose était de 5,1/100 patients/an pour les patients âgés de plus de 70 ans, contre 1,8/100 patients/an chez les patients âgés de moins de 40 ans **(GISP, 1995)**. La série de Marchioli et de ses co-auteurs, ayant inclus 1638 patients, montrait que le risque de thrombose était 8,6 fois supérieur chez les patients âgés de plus de 60 ans **(Marchioli et al., 2013)**.

Le second facteur de risque reconnu de thrombose au cours des NMP est d'avoir déjà un antécédent de thrombose. Que ce soit au cours de la TE ou de la PV, de nombreuses études ont mis en évidence ce facteur de risque. A titre d'exemple, au cours de la TE, l'étude réalisée par Carobbio et ses collègues retrouvait un HR à 1,93 (IC : 1,27-2,91, p= 0,002) d'avoir un évènement thrombotique en cas d'antécédent de thrombose **(Carobbio et al., 2011)**. L'étude réalisée par Palandri et ses co-auteurs, réalisée sur 389 patients, montrait que les patients avec un antécédent de thrombose avait un risque de 70% d'avoir un nouvel évènement thrombotique, contre 4% pour les patients sans antécédents de thrombose **(Palandri et al., 2008)**. Au cours de la PV, l'étude ECLAP retrouvait un HR de 4,85 de présenter un évènement thrombotique chez les patients avec antécédent thrombotique **(Landolfi et al., 2004)**.

B. Rôle des cellules sanguines

a. Rôle des plaquettes

1) Implication du nombre de plaquettes

Au cours de la TE, même si un nombre de plaquettes inférieur à 400G/L figure parmi les critères de réponse établis par l'European Leukemia Net **(Barosi et al., 2013)**, les résultats des études cliniques sont contradictoires concernant l'association entre le chiffre de plaquettes et le

risque de thrombose. Même si des études précoces suggéraient un effet protecteur sur le risque de thrombose d'un abaissement du nombre de plaquettes **(Cortelazzo et al., 1995)(Regev et al., 1997)**, des études ultérieures ont montré qu'une diminution de ce nombre n'était pas protectrice vis-à-vis du risque thrombotique **(Campbell et al., 2012b)(Carobbio et al., 2010)**. Pour exemple, dans l'essai prospectif PT-1 (Primary-Thrombocytemia 1), l'analyse de 776 patients avec TE n'a pas montré de corrélation entre un nombre de plaquettes élevé et un risque de thrombose accru. Au contraire, cette étude a montré un risque hémorragique plus important (HR = 3,7, IC : 1,7-8,2) dans les périodes durant lesquelles le nombre de plaquettes était supérieur à 450G/L. En cas de plaquettes supérieures à 1250 G/L, ce risque hémorragique était estimé à 10 fois supérieur par rapport au risque en présence d'un nombre de plaquettes dans les valeurs normales **(Campbell et al., 2012b)**. En effet, la présence d'un nombre de plaquettes élevé (>1500G/L) est associé à un sur-risque hémorragique, via l'acquisition d'un syndrome de Willebrand acquis **(Budde et al., 1993)**, même si des anomalies du facteur Willebrand peuvent se retrouver en présence d'un nombre de plaquettes inférieur à 600G/L **(Lancellotti et al., 2015)**. Ces données suggèrent que diminuer le nombre de plaquettes en dessous de 400 G/L n'est pas la priorité au cours de la TE, et qu'un chiffre supérieur à 1250G/L nécessite probablement la mise en place d'un traitement cytoréducteur devant le risque hémorragique accru **(Barbui et al., 2011b)**.

Au cours de la PV, un chiffre de plaquettes inférieur à 400G/L fait également partie des critères de réponse ELN 2013 **(Barosi et al., 2013)** mais les données apportées par les études cliniques sont plus contradictoires. L'analyse des données de l'essai ECLAP par Di Nisio et ses co-auteurs n'a pas montré de risque augmenté de thrombose chez les patients avec un nombre de plaquettes supérieur à 500 G/L **(Di Nisio et al., 2006)**. A l'inverse, une étude analysant la valeur pronostique des critères de réponse à l'ELN a montré que les patients ayant un nombre de plaquettes inférieur à 400G/L au cours du suivi (= réponse complète selon les critères ELN) avaient un risque de thrombose diminué par rapport aux patients ayant un taux de plaquettes supérieur à 400G/L **(Alvarez-Larran et al., 2012)**.

2) Anomalies qualitatives des plaquettes

Les premières études réalisées sur les plaquettes au cours des NMP ont premièrement montré des anomalies d'agrégation spontanée ou d'auto-agrégation **(Vreeken and van Aken, 1971)(Preston et al., 1974)** en faveur d'une activation plaquettaire. Cependant, à l'inverse de ces résultats, d'autres études ont mis en évidence des anomalies de réponse plaquettaire secondaires à des anomalies des phospholipides membranaires **(Castaldi et al., 1982)(Baker and**

Manoharan, 1988), des niveaux diminués de molécules d'adhésion à leur surface (GPIb, GPIIb-IIIa, GPVI) ainsi qu'une diminution du contenu plaquettaire en granules denses **(Russell et al., 1981)(Pareti et al., 1982)(Landolfi et al., 1995)(Schafer, 1984)** en faveur d'une diminution de fonctionnalité plaquettaire au cours des NMP. Cependant, les études les plus récentes sont en faveur d'une activation des plaquettes au cours de ces maladies. Au cours de la TE, il a ainsi été montré une augmentation d'expression à leur surface de plusieurs protéines cruciales pour l'hémostase primaire et la coagulation comme la P-sélectine **(Falanga et al., 2005)(Arellano-Rodrigo et al., 2006)** (CD62P) ou le facteur tissulaire **(Falanga et al., 2007)** (CD142), ainsi qu'une augmentation du taux agrégats leuco-plaquettaires circulants **(Falanga et al., 2005)(Arellano-Rodrigo et al., 2006)**. Autre argument en faveur d'une activation plaquettaire au cours des NMP, il a été montré que les patients avec TE avaient des taux circulants de P-sélectine soluble, de CD40 ligand **(Arellano-Rodrigo et al., 2008)**, de béta-thromboglobuline, de facteur plaquettaire 4 (platelet factor 4 ou PF4), et de thromboxane A2 (TXA2) augmentés au niveau plasmatique. Cette augmentation de TXA2 plasmatique s'accompagnait d'un taux augmenté de thromboxane B2 (TXB2) sanguin **(Santilli et al., 2008)** et urinaire **(Landolfi et al., 1992)(Jensen et al., 2000)**. Etant donné que les plaquettes fournissent une surface catalytique nécessaire à la génération de thrombine, celle-ci a été étudiée chez des patients avec TE et PV et il a été montré que la génération de thrombine était augmentée chez les patients par rapport aux témoins, et plus particulièrement chez les patients avec présence de la mutation JAK2V617F **(Panova-Noeva et al., 2011)**. De plus, une équipe a récemment montré que les plaquettes (mais également les globules rouges, les polynucléaires neutrophiles et les lymphocytes) de patients avec TE exprimaient plus de phosphatidylsérine (PS), participant ainsi à une augmentation de génération de facteur X activé, de thrombine et de fibrine **(Tong et al., 2018)**. Enfin, il a été montré chez les patients avec TE et PV un taux plus élevé de plaquettes immatures, ou plaquettes réticulées **(Panova-Noeva et al., 2011)**, qui possèdent un pouvoir hémostatique accru **(Harrison, M.S.C. Robinson, I.J. Mac, 1997)**. Il semble que les patients avec mutation JAK2V617F aient une activation plaquettaire accrue par rapport aux patients JAK2WT, au regard de certains paramètres analysés : augmentation de la génération de thrombine **(Panova-Noeva et al., 2011)**, augmentation d'expression à leur surface de facteur tissulaire et de P-Selectine **(Arellano-Rodrigo et al., 2006) (Alvarez-Larrán et al., 2008) (Falanga et al., 2007)**, augmentation du taux de plaquettes immatures circulantes **(Panova-Noeva et al., 2011)**.

L'étude des fonctions plaquettaires chez les patients avec NMP se heurte cependant à l'hétérogénéité retrouvée entre différents patients, notamment concernant les antécédents

thrombotiques, les traitements antiagrégants, ou la charge allélique qui influe certainement sur l'activation cellulaire. Ainsi, plusieurs études ont analysé les fonctions plaquettaires dans des modèles murins de NMP, permettant d'obtenir une homogénéité de charge allélique et de paramètres sanguins. Les résultats de ces études apparaissent cependant contradictoires.

Lamrani et ses collègues ont analysé les fonctions plaquettaires en utilisant deux modèles murins de NMP : un constitutif, le modèle *VavCre/JAK2^{V617F}*, et un inductible, le modèle *SCLCreER$^{t/}$JAK2^{V617F}* **(Lamrani et al., 2014)**. Etant donnée la survenue d'une recombinaison dans les cellules endothéliales dans ces modèles murins, les auteurs ont effectué des transplantations de CSH des souris *VavCre/JAK2^{V617F}* et *SCLCreER$^{t/}$JAK2^{V617F}* dans des souris wild-type. Le modèle de greffe *VavCre/JAK2^{V617F}* permet le développement d'une NMP rapide, mimant la PV au début, puis évoluant rapidement vers un phénotype évoquant la MFP. Le modèle de greffe *SCLCreER$^{t/}$JAK2^{V617F}* permet également le développement d'une NMP, mais à progression moins rapide que le modèle *VavCre/JAK2^{V617F}*. Dans leurs études, les auteurs retrouvent des résultats contradictoires avec, chez les souris *VavCre/JAK2^{V617F}*, une augmentation du temps de saignement *in vivo*, une diminution de la formation de thrombi in *vitro* (utilisation de chambres de flux coatées au collagène), une diminution d'expression de la GPVI, une diminution des multimères de hauts poids moléculaires du facteur vWF, une diminution de réponse des plaquettes à différents agonistes, mais cependant une augmentation de la formation de thrombi *in vivo* dans un modèle d'atteinte vasculaire par chlorure de fer avec la constatation d'une instabilité des thrombi formés. Les résultats sont du même ordre chez les souris *SCLCreER$^{t/}$JAK2^{V617F}*, avec une apparition moins rapide du déficit en GPVI que chez les souris *VavCre/JAK2^{V617F}*.

Les résultats de Lamrani et al. sont concordants avec les résultats d'une étude publiée la même année par Etheridge et ses co-auteurs **(Etheridge et al., 2014)**. Dans cette étude, ceux-ci utilisaient un modèle murin *Tie2Cre/FF1* permettant l'expression de la mutation JAK2V617F dans les cellules hématopoiétiques et les cellules endothéliales, ainsi qu'un modèle murin *PF4Cre/FF1*, mégacaryocytaire-spécifique. Dans le modèle *Tie2Cre/FF1*, ils montraient une diminution de formation de thrombi *in vivo* associée à une augmentation du temps de saignement, allant dans le sens d'anomalies de l'hémostase. Les auteurs ne retrouvaient pas de différences d'expression des principales intégrines à la surface des plaquettes (β3, αIIb, β1, et α2) ni de différences d'agrégation plaquettaire entre les modèles *Tie2Cre/FF1*, *PF4Cre/FF1* et les souris contrôles. Dans un second temps, les auteurs utilisèrent deux seconds modèles : un modèle de greffe de moelle de souris *Tie2Cre/FF1* dans des souris WT (permettant la présence de la mutation JAK2V617F dans le compartiment hématopoiétique) et un modèle de greffe de

moelle de souris WT dans des souris *Tie2Cre/FF1* (permettant la présence de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial). Utilisant ces deux modèles, les auteurs suggéraient que les anomalies d'hémostase retrouvées initialement étaient secondaires au compartiment endothélial : pas de différence de thrombose artérielle ni de temps de saignement dans le modèle purement hématopoiétique, et diminution de la survenue de thrombose artérielle sans différence de temps de saignement dans le modèle purement endothélial. Enfin, les auteurs analysaient le facteur von Willebrand et retrouvaient une diminution de répartition des multimères de haut poids moléculaire (HPM) dans les souris *Tie2Cre/FF1* (ainsi qu'une diminution d'agrégation à la ristocétine) en faveur d'un syndrome de Willebrand acquis. Cette anomalie de répartition des multimères de HPM n'était pas retrouvée dans les deux modèles de greffe. Cependant, les auteurs retrouvaient une diminution de l'agrégation à la ristocétine dans le modèle purement endothélial, suggérant une implication des cellules endothéliales dans cette anomalie du facteur Willebrand.

Les résultats de ces deux études sont contradictoires avec ceux d'une étude publiée un an plus tôt par Hobbs et al **(Hobbs et al., 2013)**. Dans cette étude, les auteurs, utilisant un modèle murin mimant la TE retrouvée chez les patients (modèle *MxlCre;JAK2*), apportaient des arguments en faveur d'une activation plaquettaire : augmentation de réponse à différents agonistes (thrombine, collagène), augmentation de la formation de thrombi *in vitro*, diminution du temps de saignement *in vivo*.

Enfin, plus récemment, une autre équipe a réalisé une étude sur différents modèles murins : un modèle murin entraînant la survenue d'une thrombocytose sans mutation JAK2V617F (modèle *Yall;MPL-/-*) et deux modèles déjà décrits ci-dessus, les modèles *VavCre* et *MxlCre* avec transplantation de la moelle de ces souris dans des souris wild-type. Sur le plan du phénotype thrombotique, les auteurs utilisaient différents modèles de thrombose. Dans un modèle de thrombose induite par injection de collagène et adrénaline, ils montraient que la survie des trois modèles était diminuée, du fait de la survenue de multiples thrombi. Dans un modèle de thrombose artérielle par chlorure de fer, la survenue de thrombose était augmentée dans le modèle *Yall;MPL-/-*, sans l'être dans les modèles *VavCre* et *MxlCre*. Enfin, dans un modèle de sténose de la veine cave inférieure, ils ne retrouvaient pas de différence concernant la taille ou le poids du thrombus dans les trois différents modèles par rapport aux contrôles, avec cependant une composition des thrombi plus riche en plaquettes que les souris contrôles. Sur le plan du phénotype hémorragique, les auteurs retrouvaient des résultats concordants avec l'étude de Lamrani et de ses co-auteurs avec, chez les souris *Yall;Mpl-/-* et *VavCre*, des temps de saignement augmentés et une diminution des multimères de haut poids moléculaire du facteur

Willebrand, en faveur d'un syndrome de Willebrand acquis. En revanche, les fonctions plaquettaires en elles-mêmes n'étaient pas modifiées dans les différents modèles avec des réponses d'agrégation identiques aux souris contrôles en présence de différents agonistes (ADP, collagène, thrombine) **(Strassel et al., 2015)**.

Il est donc difficile d'établir des conclusions à partir des résultats de ces études sur modèles murins. Les fonctions plaquettaires, et plus largement hémostatiques, sont probablement très dépendantes du phénotype « myéloprolifératif » de la maladie présentée par les souris. De plus, les études de Etheridge et Hobbs utilisaient des modèles murins avec expression de la version humaine de *JAK2V617F*, contrairement à l'étude de Lamrani et de ses co-auteurs, sans que nous connaissions les conséquences de la présence d'une protéine humaine dans des modèles murins. Il ne semble en tout cas pas que les fonctions plaquettaires soient altérées dans les différents modèles murins analysés mais les données disponibles suggèrent plus volontiers la présence d'un syndrome de Willebrand acquis, comme retrouvé chez les patients.

Au total, les plaquettes semblent activées chez les patients avec NMP, avec une augmentation d'expression des molécules d'adhésion à leur surface et des marqueurs d'activation plasmatiques augmentés. Cette activation plaquettaire participe très certainement à la physiopathologie de la thrombose au cours de ces maladies.

b. Rôle des leucocytes

1) Implication du nombre de leucocytes

Les études ayant analysé l'influence du nombre de leucocytes sur le risque de thrombose artérielle et veineuse au cours de la TE et de la PV apportent des résultats contradictoires.

Au cours de la TE, des études ayant inclus un grand nombre de patients ont montré qu'un nombre de leucocytes élevé au diagnostic était un facteur de risque de thrombose, que ce soit dans les territoires artériels et veineux, ou artériel seul **(Campbell et al., 2012b)(Alvarez-Larrán et al., 2013)(Carobbio et al., 2011)(Palandri et al., 2011)(Passamonti et al., 2009) (Carobbio et al., 2008a)(Carobbio et al., 2008b)(Carobbio et al., 2007)(Wolanskyj et al., 2006)(Buxhofer-Ausch et al., 2016)**. Il est à noter que le chiffre seuil de globules blancs retenu était très variable entre les études, allant de 8,4G/L **(Buxhofer-Ausch et al., 2016)** à 15G/L **(Wolanskyj et al., 2006)**. Il a également été montré qu'un nombre de globules blancs élevé était un facteur de risque de récurrence de thrombose chez les patients jeunes **(De Stefano et al.,**

2009). A l'inverse, ces résultats n'ont pas été confirmé dans d'autres études **(Barbui et al., 2012b)(Girodon et al., 2010)(Passamonti et al., 2008)(Chim et al., 2005)(Montanaro et al., 2014)** notamment dans celles ayant inclus un grand nombre de patients, comme l'étude de Montanaro et al. avec 1144 patients, ou l'étude de Barbui et al. ayant inclus 891 patients.

Au cours de la PV, les données issues de l'essai ECLAP ont montré qu'un nombre de GB supérieur à 15G/L était associé à un risque plus élevé de thrombose majeure (HR : 1,71, IC : 1,10-2,75) et d'infarctus du myocarde (HR : 2,84, IC : 1,25-2,46) sans augmentation du risque de thrombose veineuse **(Landolfi et al., 2007)**. Cependant, une autre étude parue en 2010, ayant inclus 338 patients, ne mettait pas en évidence la présence d'une leucocytose supérieure à 11G/L comme facteur de risque de thrombose **(Passamonti et al., 2010)**.

En conclusion, il est difficile de se faire une idée franche sur l'influence de la leucocytose sur le risque de thrombose. Il semblerait cependant que ce risque soit plus important au niveau du territoire artériel.

2) Anomalies qualitatives des leucocytes

Les polynucléaires neutrophiles représentent le compartiment le plus important des leucocytes et jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire et l'activation du système de coagulation. Au cours de la TE et de la PV, des arguments plaident pour une activation accrue des polynucléaires neutrophiles. Il a notamment été retrouvé chez les patients avec TE, PV et MFP une augmentation à leur surface d'expression du CD11b, marqueur d'activation du PNN **(Falanga et al., 2005)(Alvarez-Larrán et al., 2008)**. De même, il a été montré que les PNN de patients avec TE avaient une expression augmentée de facteur tissulaire, protéine jouant un rôle dans le déclenchement de la voie extrinsèque de la coagulation **(Falanga et al., 2007)**. Dans cette même étude, les auteurs retrouvaient une augmentation d'expression à la surface des PNN de marqueurs d'activation du PNN : CD14 et LAP (leucocyte alcaline phosphatase), plus particulièrement chez les patients avec mutation JAK2V617F. Il a été également montré des taux circulants d'agrégats leuco-plaquettaires augmentés (CD11b-CD42b et CD11b-CD62P) chez les patients avec TE, témoignant d'interactions entre leucocytes et plaquettes augmentées au cours des NMP. Les patients avec mutation JAK2V617F avaient des taux augmentés par rapport aux patients sans mutation **(Falanga et al., 2005).** Enfin, en faveur d'une activation accrue des PMN au cours des NMP, il a été montré des taux circulants d'élastase et de myélopéroxydase, protéines relarguées par les PNN en cas d'activation, augmentés dans le plasma des patients avec PV et TE **(Falanga et al., 2000)**. Récemment, l'équipe de Thomas Fischer a étudié l'expression des intégrines β1 (ou VLA-4) et β2 (ou LFA1) chez des patients avec NMP JAK2V617F **(Gupta**

et al., 2017) et dans un modèle murin *Vav;Cre;JAK2V617F* **(Edelmann et al., 2018)**. Les auteurs ont premièrement montré que l'adhésion des cellules mononuclées (CMN) de patients avec NMP JAK2V617F était augmentée en présence d'un support coaté avec VCAM-1 (ligand de VLA4 ou β1-intégrine) et en présence de VCAM-1 soluble. Dans ce même article, les auteurs montraient que la protéine Rap1 était activée dans les CMN de patients, et que son inhibition menait à une diminution de leur adhésion, suggérant une activation de Rap1 médiée par JAK2V617F et menant à une augmentation de l'intégrine β1 à la surface des CMN **(Gupta et al., 2017)**. Dans un second article publié récemment, la même équipe a utilisé un modèle murin *Vav;Cre;JAK2V617F*. Dans cette étude, les auteurs confirment ce qui était retrouvé chez les patients avec une augmentation des taux de β1- et β2- intégrine dans les PNN des souris *Vav;Cre ;JAK2V617F* et une adhésion des PNN augmentée en présence de VCAM-1 et ICAM-1. Les auteurs montrent également que cette augmentation d'expression des intégrine β1 et β2 est médiée par l'activation des voies PI3K et CalDAG-GEFI, et une activation de la protéine Rap1. Enfin, les auteurs montrent que l'inhibition de l'intégrine β2 entraîne une diminution de la survenue de thrombose dans un modèle de sténose de la veine cave inférieure. Les résultats de ces deux études confirment l'existence d'une activation des PNN en présence de JAK2V617F, avec une augmentation d'expression des β1 et β2 intégrines à leur surface, menant à une augmentation de leur adhésion et une participation dans la physiopathologie de la thrombose des NMP **(Edelmann et al., 2018)**. De manière intéressante, ces résultats dans les PNN confirment ce que l'équipe de De Grandis et co-auteurs avaient retrouvé dans les érythrocytes avec mutation JAK2V617F, c'est-à-dire une activation de la protéine Rap1 médiée par la mutation JAK2V617F.

Au total, ces données démontrent que les polynucléaires neutrophiles sont activés au cours des NMP. A noter cependant, qu'au début de ce travail, aucune donnée n'était disponible sur le rôle des polynucléaires neutrophiles et du phénomène de NETose dans la physiopathologie de la thrombose des NMP.

Les monocytes jouent un rôle important dans l'initiation de la thrombose veineuse profonde **(von Brühl et al., 2012)**, et participent à la formation de la plaque d'athérosclérose **(Swystun and Liaw, 2016)**. Moins étudiées au cours des NMP, des arguments plaident cependant pour une activation de ces cellules lors de ces maladies : augmentation d'expression de CD11b à leur surface au cours de la MFP **(Alvarez-Larrán et al., 2008)**, augmentation des agrégats entre monocytes et plaquettes **(Kaplar et al., 2000)**, augmentation d'expression de facteur tissulaire à leur surface au cours de la PV **(Kornberg et al., 1997**).

c. *Rôle des globules rouges*

1) *Implication du taux d'hématocrite*

Les premières données indiquant que le risque de thrombose au cours de la PV est proportionnel au niveau d'hématocrite remontent à 1978, avec l'étude de Pearson et Wheterley-Mein. Dans cette étude portant sur 68 patients, les auteurs montraient que le risque thrombotique à 10 ans était de 0,2% si l'hématocrite était inférieur à 44%, contre 0,92% si l'hématocrite était compris entre 45 et 49%, et 7,5% en cas d'hématocrite supérieur à 60% **(Pearson and Wetherley-Mein, 1978)**. Dans les années qui ont suivi, les études cliniques ont retrouvé des résultats contradictoires. En 2007, l'analyse des données issues de l'étude ECLAP ne montraient pas de sur-risque de thrombose en cas d'hématocrite supérieur à 50% **(Di Nisio et al., 2006)**. En 2010, une étude rétrospective portant sur 226 patients montrait qu'il y avait un risque accru de thrombose (HR : 1,17, IC : 1,04-1,31) en cas d'hématocrite supérieur à 48% **(Crisà et al., 2010)** tandis qu'en 2012, une étude portant sur 261 patients suivis sur une durée médiane de 7 ans ne retrouvait pas comme facteur de risque d'avoir une thrombose le fait d'avoir un hématocrite supérieur à 45% **(Alvarez-Larran et al., 2012)**. Même si les données fondamentales incitaient chacun à vouloir abaisser le seuil d'hématocrite chez les patients avec PV, il a fallu attendre 2013 et la réalisation d'une étude prospective randomisée pour confirmer la pertinence d'atteindre un niveau d'hématocrite inférieur à 45% chez les patients avec PV. Dans cette étude, les patients étaient randomisés en deux bras d'étude : un bras avec un objectif d'hématocrite inférieur à 45%, un bras avec un objectif d'hématocrite compris entre 45 et 50%. Les auteurs retrouvaient un risque de décès secondaire à un évènement cardio-vasculaire ou thrombotique plus élevé chez les patients avec un hématocrite supérieur à 45% (HR : 3,91, IC : 1,45-10,53) et un risque d'évènement cardio-vasculaire également augmenté (HR : 2,69, IC : 1,19-6,12) **(Marchioli et al., 2013)**, confirmant l'objectif de 45% comme niveau d'hématocrite à atteindre et à maintenir au cours de la PV. La présence d'un taux d'hématocrite élevé a des conséquences rhéologiques, bien que celles-ci soient différentes selon le territoire vasculaire. En présence d'un flux sanguin à bas débit, comme c'est le cas dans le territoire veineux, un taux d'hématocrite élevé va principalement induire une hyperviscosité, un ralentissement du flux et une hypoxémie relative des territoires atteints. Au niveau des petits vaisseaux, peut survenir une obstruction vasculaire entraînant les signes d'hyperviscosité retrouvés au cours de la PV. En présence d'un flux sanguin à haut débit, comme c'est le cas dans le territoire artériel, cet hématocrite élevé va induire un déplacement des plaquettes en périphérie du vaisseau, à proximité de l'endothélium, favorisant les interactions entre les plaquettes et les cellules endothéliales induisant une

activation plaquettaire accrue mais également des interactions plaquettes-plaquettes augmentées **(Pearson, 1997)(Turitto and Weiss, 1983)(Turitto and Weiss, 1980)**. Le rôle de l'hématocrite et de la masse globulaire dans la survenue de thrombose au cours des NMP JAK2V617F a été étudié dans un article récent. Dans cet article, les auteurs étudient la pleckstrine-2 (Plek2), protéine impliquée dans la dynamique des filaments d'actine et jouant un rôle au cours de l'érythropoièse **(Zhao et al., 2014)**. Les auteurs montrent que la PleK2 est activée par l'érythropoiétine (EPO) via la voie JAK/STAT5, et surexprimée dans un modèle murin *Vav;Cre;JAK2V617F* ainsi que chez les patients avec NMP JAK2V617F. De manière intéressante, les auteurs montrent également que la délétion de PleK2 dans le modèle *Vav;Cre;JAK2V617F* conduit à une diminution de la masse globulaire, une diminution de la survenue de thrombose et à une amélioration de la survie des souris. Cet article révèle donc une nouvelle cible potentielle (PleK2) en amont de la voie JAK/STAT au cours des NMP avec mutation JAK2V617F et confirme le rôle crucial d'une masse globulaire élevée dans la physiopathologie de la thrombose des NMP **(Zhao et al., 2017)**.

2) Anomalies qualitatives des globules rouges

Il existe également au cours de la PV des anomalies qualitatives des globules rouges. Il a notamment été montré que les globules rouges de patients avec PV adhéraient plus aux cellules endothéliales *in vitro*, en conditions statiques et en conditions de flux **(Wautier et al., 2007)**. Dans leur étude, Wautier et ses co-auteurs montraient que cette augmentation d'adhésion était médiée par une phosphorylation accrue d'une protéine de membrane du GR, Lu/BCAM (erythroid Lutheran/Basal cell-adhesion molecule), permettant l'interaction de Lu/BCAM avec la laminine au niveau des cellules endothéliales. La même équipe confirma quelques années plus tard que la mutation JAK2V617F était responsable de cette phosphorylation accrue de Lu/BCAM, via notamment la voie Rap1/AKT, et de manière indépendante du récepteur à l'EPO **(De Grandis et al., 2013)**.

C. Rôle des cellules endothéliales

De manière physiologique, l'endothélium facilite l'écoulement du flux sanguin en fournissant une surface anti-thrombotique inhibant l'adhésion plaquettaire ainsi que l'activation de la cascade de la coagulation. Des études ont apporté des arguments en faveur d'une activation du compartiment endothélial au cours des NMP. Il a été retrouvé chez les patients avec TE

(Falanga et al., 2007), PV **(Falanga et al., 2000)(Santilli et al., 2008)**, MFP **(Alvarez-Larrán et al., 2008)** et tous NMP **(Jensen et al., 2002)** des taux circulants augmentés de thrombomoduline en faveur d'une activation du compartiment endothélial au cours de ces maladies. Autre marqueur d'activation endothéliale, le facteur von Willebrand (vWF) a été retrouvé augmenté chez les patients avec TE et PV **(Falanga et al., 2000)**, tout comme les sélectines E et P-Selectine **(Belotti et al., 2011)(Cella et al., 2010)**. Les cellules endothéliales ont la capacité de relarguer du nitrite d'oxyde (NO) exerçant un rétrocontrôle négatif sur la propagation du thrombus. Le NO est un produit radical libre issu de l'oxydation de la L-arginine en L-citrulline par des NO synthases. Le NO dérivé des cellules endothéliales permet la relaxation de la paroi vasculaire en réponse au « shear stress », l'inhibition de l'adhésion et de l'activation plaquettaire, et la diminution de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales **(Freedman and Loscalzo, 2003)**. Il a été montré que les patients avec TE avaient des taux circulants de NO diminués par rapport aux patients contrôles, et que les patients avec un traitement par hydroxyurée avaient des taux de NO augmenté par rapport aux patients non traités, suggérant que l'hydroxyurée participerait à l'inhibition de la survenue de thrombose via un effet sur la voie du NO **(Cella et al., 2010)(Piccin et al., 2017)**. Enfin, des taux de cellules endothéliales circulantes (CEC), cellules endothéliales « détachées » de l'endothélium lors de situations d'agression ou de stress, ont été retrouvés augmentés chez les patients avec NMP, que ce soit à l'état de repos ou à l'état activé **(Treliński et al., 2010)(Alonci et al., 2008)(Belotti et al., 2011)(Torres et al., 2013)**. Autre mécanisme récemment décrit, l'action de l'héparanase semble également importante dans la physiopathologie de la thrombose des NMP. L'héparanase est une enzyme qui clive les chaînes latérales des héparanes sulfates à la surface des cellules. Il a été montré que l'héparanase interagissait avec le TFPI (augmentation des taux de TFPI et dissociation du TFPI) **(Nadir et al., 2008)** à la surface des cellules endothéliales et augmentait l'activité pro-coagulante du facteur tissulaire avec activation du facteur V en présence de facteur VII activé **(Nadir et al., 2006)(Nadir et al., 2010)**. Dans un article récent, la même équipe a retrouvé une expression augmentée d'héparanase et de TFPI au niveau de biopsies ostéo-médullaires de patients avec NMP, en particulier chez les patients avec TE JAK2V617F. Dans ce même article, les auteurs retrouvaient une expression d'héparanase et une activité pro-coagulante de celle-ci augmentée dans des cellules transduites avec la mutation JAK2V617F. Cette augmentation d'héparanase était diminuée en présence d'un inhibiteur de JAK (ruxolitinib) et d'hydroxyurée **(Kogan et al., 2016)**. Ces données suggèrent donc un mécanisme supplémentaire participant à la physiopathologie de la thrombose des NMP. Enfin, cité plus haut, l'article de Tong et de ses co-auteurs a montré que des cellules endothéliales mises en contact avec de

cellules sanguines de patients avec TE exprimaient des taux augmentés de phosphatdyl-sérine (PS), participant à une génération accrue de facteur X activée et de thrombine **(Tong et al., 2018)**.

D. Rôle des facteurs plasmatiques

Les microparticules (MP) circulantes sont des fragments de membrane cytoplasmique de taille comprise entre 0,1 et 1 µm, relargués par les cellules sanguines et les cellules endothéliales en cas d'activation ou d'apoptose. Les MP possèdent un pouvoir pro-coagulant via notamment la présence à leur surface de facteur tissulaire et de phospholipides (phosphatidylsérine). Des études ont suggéré leur participation dans la physiopathologie de la thrombose associée au cancer **(Geddings and Mackman, 2013)**, ainsi qu'au cours des maladies cardio-vasculaires **(Boulanger et al., 2017)**. Des taux circulants augmentés de MP ont été retrouvés au cours des NMP dans de nombreuses études, sans cependant qu'il n'y ait eu de lien établi entre les taux de MP et les antécédents thrombotiques des patients, ni de différences selon le type de NMP **(Trappenburg et al., 2009)(Charpentier et al., 2016)(Kissova et al., 2015)**. Il a également été montré que les MP de patients avec NMP entraînaient une génération de thrombine accrue **(Marchetti et al., 2014)(Duchemin et al., 2010)**, via une inhibition de la génération de thrombine par la thrombomoduline diminuée **(Duchemin et al., 2010)**. Enfin, deux études ont montré que les taux de microparticules circulantes étaient augmentés en présence de la mutation JAK2V617F **(Charpentier et al., 2016)(Marchetti et al., 2014)**.

Des marqueurs d'activation de la coagulation (complexe thrombine anti-thrombine, D-Dimères, fragment de la prothrombine) ont été retrouvés augmentés chez les patients avec NMP **(Falanga et al., 2007)(Arellano-Rodrigo et al., 2008)**. La protéine C (PC), sérine protéase activée par la thrombine liée à la thrombomoduline endothéliale, est un acteur anticoagulant majeur chez l'homme. Lorsqu'elle est activée, la protéine C activée (PCA), couplée à son cofacteur, la protéine S (PS), inhibe l'activation de la coagulation via l'inactivation des facteurs de coagulation V et VIII. Une résistance à cette inactivation par la protéine C activée ou RPCA, héréditaire ou acquise, est associée à un risque de thrombose accrue, en particulier lors de situations à risque, comme la grossesse, un traitement par oestro-progestatifs, ou la présence d'un cancer. Des niveaux abaissés de PC et de PS peuvent participer à une RPCA. Il a été retrouvé une diminution des taux de PC et PS, ainsi qu'une RPCA chez les patients avec NMP **(Bucalossi et al., 1996)**, et ce de manière plus fréquente chez les patients avec antécédents de thrombose **(Arellano-Rodrigo et al., 2006)**, et chez les patients avec mutation JAK2V617F

(Arellano-Rodrigo et al., 2008). Il a également été montré une inactivation de la protéine S plus importante chez les patients avec TE, participant de ce fait à une activation accrue de la coagulation au cours de la TE **(Dienava-Verdoold et al., 2012)**.

E. Rôle du statut mutationnel

Devant des données fondamentales suggérant une activation cellulaire médiée par la mutation JAK2V617F, participant à la physiopathologie de la thrombose, la question se pose de savoir si le statut mutationnel est prédictif de la survenue de thrombose.

Au cours de la PV, étant donnée la proportion élevée de patients avec mutation JAK2V617F, se pose essentiellement la question de l'influence de la charge allélique JAK2V617F et de l'impact d'une autre mutation (mutation de l'exon 12) sur le risque thrombotique. Concernant l'influence de la mutation de l'exon 12, peu de données sont disponibles. Une étude parue en 2011 portant sur 106 patients a montré que l'incidence de thrombose était similaire chez les patients avec mutation de l'exon 12 et patients avec mutation JAK2V617F, avec un taux de thrombose de 1,9/100 patients/an **(Passamonti et al., 2011)**. Une étude récente a confirmé ces résultats, en comparant 33 patients avec mutation de l'exon 12 et une cohorte de 364 patients avec mutation JAK2V617F. Dans cette étude, les auteurs retrouvaient des taux de thrombose au diagnostic et au suivi, au niveau artériel et veineux, identiques entre les deux groupes **(Tefferi et al., 2017)**. Concernant l'influence de la charge allélique sur le risque thrombotique, les données disponibles sont contradictoires. Une étude portant sur 173 patients a montré que les patients ayant une charge allélique supérieure à 75% avait un sur-risque de thrombose par rapport aux patients dont la charge allélique était inférieure à 75% **(Vannucchi et al., 2007)**. Une autre étude parue en 2015 incluait dans son analyse statistique des patients avec PV et TE, et montrait que les patients avec une charge allélique supérieure à 20% avait un sur-risque de thrombose (risque relatif à 7) au niveau veineux mais pas artériel **(Borowczyk et al., 2015)**. A l'inverse, d'autres études ne retrouvaient pas de corrélation entre la charge allélique JAK2V617F et le risque de thrombose artérielle ou veineuse **(Passamonti et al., 2008)(Silver et al., 2011)(Koren-Michowitz et al., 2012)**. Au total, la charge allélique JAK2V617F au diagnostic ne semble pas être un marqueur de risque de thrombose au cours du suivi au cours de la PV, d'autant qu'il est possible que cette charge allélique évolue au cours du temps.

Au cours de la TE, la présence d'une mutation JAK2V617F est associée à un risque de thrombose augmenté comparativement à l'absence de mutation JAK2V617F. A titre d'exemple, l'étude de Carobbio publiée en 2011 a montré que la présence de JAK2V617F était associée à un risque augmenté de thrombose majeure (HR : 2,04 ; IC : 1,19-3,48) et de thrombose artérielle (HR : 2,57 ; IC : 1,27-5,19) mais pas de thrombose veineuse (HR : 1,43 ; IC : 0,65-3,11) **(Carobbio et al., 2011)**. De même, une revue systématique de la littérature a montré que les patients avec TE JAK2V617F + avaient un risque de thrombose multiplié par 2 (OR : 1,92 ; IC : 1,45-2,53) par rapport aux patients sans mutation JAK2V617F **(Lussana et al., 2009)**. Concernant la valeur de charge allélique JAK2V617F, celle-ci semble avoir une influence plus importante qu'au cours de la PV. En effet, plusieurs études n'incluant que des patients avec TE ont montré qu'une charge allélique JAK2V617F élevée était associée à un risque de thrombose augmenté **(Antonioli et al., 2008)(Pich et al., 2012)(Kittur et al., 2007)(Borowczyk et al., 2015)**. Il est cependant difficile de déterminer un cut-off de charge allélique JAK2V617F à partir des données disponibles, celui-ci variant de 12,5% **(Pich et al., 2012)** à 50% **(Antonioli et al., 2008)** dans les études. Concernant les mutations MPL et CALR, des études ont montré que le risque thrombotique était moins important en présence d'une mutation CALR ou MPL, que ce soit au diagnostic ou au suivi. Ainsi, dans l'article de Klampfl et de ses collègues, il était retrouvé une incidence cumulative de thrombose à 10 ans à 11% chez les patients avec mutation *CALR* contre 21% chez les patients avec mutation JAK2V617F, et 9,3% chez les patients avec mutation MPL **(Klampfl et al., 2013)**. Ces résultats ont été confirmés dans des études ultérieures **(Gangat et al., 2014)(Bertozzi et al., 2016b)**. A titre d'exemple, en 2014, dans une étude portant sur 717 patients avec TE, les auteurs retrouvaient confirmaient une incidence moindre de thrombose chez les patients avec TE *CALR*+ par rapport aux patients avec TE *JAK2*V617F + (incidence de thrombose à 15 ans de 10,5% versus 25,1%) **(Rumi et al., 2014)**.

Au cours de la MFP, une étude portant sur 707 patients avec MFP retrouvait une association entre le statut JAK2V617F positif et la survenue de thrombose (HR : 1,92 ; IC : 1,10-3,34), particulièrement lorsque ce statut JAK2V617F positif était associé à une leucocytose (HR : 3,13 ; IC : 1,26-7,81) **(Barbui et al., 2010)**. Comme au cours de la TE, il est également retrouvé une incidence de thrombose moins importante chez les patients avec mutation *CALR* et *MPL* par rapport aux patients avec mutation JAK2V617F. Une étude portant sur 617 patients a montré une incidence de thrombose à 10 ans de 13,6% (IC : 6,9-22,7%) chez les patients *CALR*+, versus 18,3% (IC : 13,3-24,1%) chez les patients avec mutation JAK2V617F **(Rumi et al., 2014)**. Des résultats similaires ont été retrouvés en 2015 parmi une cohorte de 418 patients avec MFP au sein de laquelle il était mis en évidence une incidence cumulative d'évènements

cardio-vasculaires à 0,80% patients/année en présence de mutation *CAL*R contre 0,85% patients/année en présence de mutation MPL et 2,52% patients/année en présence de mutation JAK2V67F **(Finazzi et al., 2015)**.

F. Rôle des facteurs de risque cardio-vasculaires

Au cours de la TE, la présence de facteurs de risque cardio-vasculaires semble associée à un risque plus élevé de thrombose artérielle. Dans l'étude ayant permis l'établissement du score pronostique IPSET-Thrombosis et incluant la notion de facteurs de risque cardio-vasculaires dans celui-ci, Barbui et ses co-auteurs retenaient comme facteurs de risque le tabagisme, l'hypertension artérielle et le diabète **(Barbui et al., 2012c)**.

Au cours de la PV, les résultats concernant l'impact de la présence de facteurs de risque cardio-vasculaires sont plus contradictoires. En 2013, une étude portant sur 1545 patients avec PV ne retrouvait pas d'association entre la présence de diabète et d'hypertension artérielle et la survenue d'évènements thrombotiques **(Tefferi et al., 2013)**. Deux études récentes publiées par la même équipe confirmaient ces résultats en ne retrouvant pas d'association entre la présence de facteurs de risque cardio-vasculaires et la survenue de thrombose **(Alvarez-Larrán et al., 2015)(Alvarez-Larrán et al., 2017)**. A l'inverse, une étude récente ayant étudié spécifiquement le facteur « hypertension artérielle » chez des sujets avec PV à bas risque (âge inférieur à 60 ans sans antécédents de thrombose) retrouvait un sur-risque de thrombose chez les patients avec hypertension artérielle (2,05% patients/année chez les patients avec HTA versus 0,85% patients/année chez les patients sans HTA). Les auteurs suggèrent dans cette étude que la présence d'une HTA au cours de la PV serait le témoin d'une hyperviscosité sanguine, entraînant une augmentation des résistances artérielles **(Barbui et al., 2017)**.

En conclusion, il semblerait que la présence de facteurs de risque cardio-vasculaires entraîne un sur-risque de thrombose au cours de la TE, mais pas de la PV. Les analyses des études sont cependant rendues difficiles par le fait que les facteurs de risque pris en compte ne sont pas homogènes entre les études. Quoiqu'il en soit, il paraît logique d'adopter une attitude au moins similaire à celle adoptée chez les patients sans NMP, c'est-à-dire dépister et prendre en charge les facteurs de risque cardio-vasculaires chez les patients avec NMP.

IV. Stratification du risque de thrombose au cours des NMP BCR-ABL négatif

La stratification des patients permettant de déterminer leur risque de thrombose ou d'hémorragie est basée sur les facteurs de risque de thrombose décrits précédemment, et de cette stratification découle la prise en charge thérapeutique.

De manière schématique, concernant les patients avec TE et PV, les deux principaux risques sont l'âge supérieur à 60 ans et un antécédent de thrombose. Les patients seront classés en patients à « faible risque » de thrombose en l'absence d'un de ces deux critères et ne nécessiteront la plupart du temps pas de traitement cytoréducteur. En cas de présence d'au moins un des deux critères, les patients seront classés à « haut risque » de thrombose et dans ce cas-là un traitement cytoréducteur sera débuté.

D'autres classifications ont été proposées, notamment au cours de la TE, non utilisées pour le moment en pratique clinique.

A. Au cours de la TE

Il existe deux scores pronostiques de thrombose au cours de la TE.

Le premier est issu des recommandations de l'European Leukemia Net et comprend trois facteurs de risque : l'âge supérieur ou inférieur à 60 ans, la présence d'un antécédent de thrombose ou d'hémorragie, la présence d'un taux de plaquettes supérieur à 1500 G/L. Un patient est considéré à faible risque de thrombose en cas d'âge inférieur à 60 ans, d'absence d'évènement thrombotique ou hémorragique et d'un taux de plaquettes inférieur à 1500G/L. Un patient est considéré à haut risque de thrombose en cas d'âge supérieur à 60 ans ou d'antécédent d'évènement thrombotique ou hémorragique. La présence d'un taux de plaquettes >1500G/L place le patient dans un groupe à haut risque hémorragique, ce qui nécessitera également le début d'un traitement cytoréducteur **(Barbui et al., 2011b)**.

Le second score pronostique, nommé IPSET-Thrombosis (International Prognostic Score of Thrombosis for Essential Thrombocythemia) ajoute deux facteurs de risque de thrombose à ceux retenus dans le premier score : la présence de la mutation JAK2*V617F* et la présence de facteurs de risque cardio-vasculaires. Ceci car, comme dit plus haut, ces facteurs ont été associés à un risque plus élevé de thrombose **(Carobbio et al., 2011)**·**(Barbui et al., 2012c)**. Un poids en points est attribué à chacun des items (1 point pour l'âge et la présence de facteurs de risque cardio-vasculaires, 2 points pour l'antécédent de thrombose et la mutation JAK2V617F) et ce

score définit trois groupes : patients à faible risque de thrombose (0-1 point), patients à risque intermédiaire (2 points), patients à haut risque (supérieur ou égal à 3 points). En 2015, ce score pronostique a été légèrement révisé à partir d'une cohorte de 1019 patients pour définir quatre groupes : risque très bas, risque bas, risque intermédiaire et risque élevé **(Barbui et al., 2015b)**. Enfin, ce score révisé a été validé de manière externe en 2016 sur une cohorte de 585 patients par l'équipe de Tefferi **(Haider et al., 2016)**, mais non validé dans des études prospectives.

B. Au cours de la PV

Il existe un seul score pronostique de thrombose au cours de la PV défini par la présence des facteurs de risque de thrombose que sont un âge supérieur à 60 ans et un antécédent de thrombose. La présence d'un de ces deux facteurs classe le patient en « haut risque » de thrombose et il est alors recommandé de débuter un traitement cytoréducteur.

C. Au cours de la MFP

Il n'existe pas de score pronostique de thrombose spécifique au cours de la MFP et les critères pris en compte pour définir les patients à haut risque de thrombose sont les mêmes qu'au cours de la TE et de la PV, soit un âge supérieur à 60 ans et un antécédent de thrombose.

V. Prise en charge thérapeutique du risque thrombotique au cours de la TE et de la PV

Au cours de la TE, la survie est proche de celle de la population ajustée pour l'âge et le sexe avec une médiane de survie de 20 ans **(Tefferi et al., 2014c)**. Le risque d'évolution en myélofibrose secondaire est compris entre 4 et 11%, et celui de transformation en leucémie aiguë (LA) estimé à 2% à 15 ans **(Cerquozzi and Tefferi, 2015)**. Au cours de la PV, la médiane de survie est de 14 ans **(Tefferi et al., 2014c)** avec un risque d'évolution en myélofibrose secondaire compris entre 6 et 14%, et un risque de transformation en LA compris entre 5,5 et 18,9 **(Cerquozzi and Tefferi, 2015**). En revanche, au cours de ces deux NMP, le risque de thrombose durant l'évolution est important.

L'objectif principal du traitement au cours de la TE et de la PV est donc la prévention des complications thrombotiques et hémorragiques. L'objectif secondaire est de contrôler, s'ils sont présents, les symptômes liés à l'atteinte microcirculatoire.

La prise en charge thérapeutique repose donc sur le risque de thrombose de chaque patient défini par les critères décrits ci-dessus.

A. Place de l'aspirine

Au cours de la PV, un traitement par aspirine est recommandé dans quasiment toutes les situations, patients à bas risque ou haut risque de thrombose, en dehors d'une situation à risque hémorragique ou d'un traitement anticoagulant en cours **(Barbui et al., 2011b)**. Ces recommandations ont été émises à la suite de la publication des données de l'essai ECLAP qui a montré le bénéfice en terme de prévention de la survenue de thrombose d'un traitement par aspirine à la dose de 100 mg par jour **(Landolfi et al., 2004)**. Dans cet essai clinique ayant inclus 1638 patients, les patients étaient séparés en deux bras : un bras observationnel et un bras « traitement par aspirine ». Les auteurs ont montré qu'un traitement par aspirine entraînait une diminution du taux de thromboses totales (6,7 versus 15,5%), et du taux de thromboses mineures (4 versus 8,3%). Ils retrouvaient également une significativité sur le critère composite « taux d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral ou décès + thrombose veineuse profonde et embolie pulmonaire » (5,1 versus 10,9%).

Au cours de la TE, les recommandations sur la prescription d'aspirine ont été calquées sur celles émises au cours de la PV, même si aucune étude prospective n'a été réalisée. Une étude rétrospective publiée en 2010 a analysé 300 patients avec TE de faible risque, en comparant les

patients sans aspirine versus les patients avec aspirine. Les auteurs ne retrouvaient pas de différence significative de survenue de thrombose entre les deux bras, avec un excès de saignements (sans différence statistiquement significative) dans le bras aspirine. Cependant, dans le sous-groupe des TE avec mutation JAK2V617F, les auteurs montraient un bénéfice de l'aspirine sur la survenue de thrombose veineuse, et non artérielle **(Alvarez-Larran et al., 2010)**. Dans les TE à haut risque, la même équipe publia en 2013 une étude rétrospective à propos de 247 patients, en comparant l'attitude « cytoréduction seule » versus « cytoréduction + aspirine ». Les auteurs ne retrouvaient pas de différence significative en terme de survenue de thrombose (cytoréduction seule : 24,8 évènements/1000 patients/an versus cytoréduction + aspirine : 14,4 évènements/1000 patients/an) mais une différence significative en terme de saignement (1,4 versus 14,4 évènement/1000 patients/an). Dans le sous-groupe de patients âgés de plus 60 ans, les auteurs retrouvaient cependant une différence significative concernant la survenue de thrombose. Ils recommandaient donc la prescription d'aspirine chez les patients avec TE à haut risque âgés de plus de 60 ans **(Alvarez-Larrán et al., 2013)**. Enfin, en 2016, la même équipe publia les données issues de l'analyse d'une série de 433 patients avec TE à bas risque, dont 162 avec mutation de *CALR* et 281 avec mutation de *JAK2*. Dans cet article, les auteurs montrent que chez les patients avec mutation *CALR*, la prescription d'aspirine n'entraîne pas de bénéfice en terme de thrombose, mais entraîne un sur-risque de saignement. Chez les patients avec mutation JAK2V617F, ils retrouvent des résultats similaires à leur étude de 2010, c'est-à-dire un bénéfice en terme de survenue de thrombose veineuse **(Alvarez-Larran et al., 2016)**. Chez les TE à haut risque du fait d'un antécédent de thrombose, une étude publiée en 2008 et incluant des patients avec PV et TE ayant présenté un évènement thrombotique a analysé l'effet d'un traitement par aspirine sur la récidive d'évènement thrombotique. Dans cette étude, les auteurs montraient qu'un traitement par aspirine (en plus d'un traitement cytoréducteur) ne diminuait pas le risque de récidive en cas de premier évènement artériel, avec une réduction du risque seulement en cas de premier évènement veineux **(De Stefano et al., 2008)**.

Au total, chez les patients avec TE à bas risque, il semble indiqué de prescrire de l'aspirine à faible dose chez les patients avec mutation JAK2V617F. Chez les autres, l'observation seule est possible. Chez les patients avec TE à haut risque, même si des équipes recommandent de prescrire de l'aspirine en absence ou en présence de mutation JAK2V617F, les données disponibles dans la littérature incitent à bien évaluer le rapport bénéfice/risque hémorragique de cette prescription.

a. *Aspirine et syndrome de Willebrand acquis*

En cas de thrombocytose majeure (supérieure à 1000G/L) ou d'évènement hémorragique, il est recommandé de rechercher un syndrome de Willebrand acquis, caractérisé par une absence ou une diminution des multimères de facteur Willebrand de haut poids moléculaire secondaire à une protéolyse accrue par l'ADAMTS13. Pour cela, il faut doser l'activité cofacteur de la ristocétine du facteur vWF qui sera abaissée, le dosage du facteur VIII ou antigénique du vWF pouvant être normaux, ou même augmentés **(Lancellotti et al., 2015)**. Un syndrome de Willebrand acquis peut se voir en l'absence de thrombocytose majeure, et devant une symptomatologie hémorragique chez un patient avec TE ; il faudra donc le rechercher **(Elliott and Tefferi, 2004)**. Dans ces situations, il faudra donc discuter de l'intérêt et du rapport bénéfice/risque du traitement par aspirine et probablement le suspendre en cas d'activité cofacteur de la ristocétine du facteur vWF inférieure à 30% **(Tefferi and Barbui, 2017)**.

b. *Une place pour l'aspirine à double-dose au cours de la PV et de la TE ?*

Des données fondamentales ont montré que l'aspirine à double-dose pouvait avoir un intérêt dans la prise en charge des NMP. Une étude parue en 2012 a montré, chez des patients avec TE, que l'aspirine à la dose de 200mg/jour entraînait une inhibition de l'agrégation plaquettaire supérieur à l'aspirine à la dose de 100 mg/jour **(Dillinger et al., 2012)**. Une autre étude a suggéré qu'au cours de la TE, la mégacaryopoïèse accélérée était responsable d'une production de plaquettes non affectées par l'aspirine, entraînant de ce fait une production de thromboxane A2 augmentée. L'aspirine à double-dose pourrait donc avoir une place au cours de cette maladie, du fait d'une physiopathologie particulière **(Pascale et al., 2012)**. Les mêmes auteurs suggèrent une surveillance de l'efficacité du traitement par aspirine via un dosage de thromboxane B2, avec un seuil de mauvaise efficacité en cas de taux supérieur à 4 ng/ml **(Patrono et al., 2013)**. De ces données fondamentales, Tefferi et Barbui, dans des articles récents, introduisent l'aspirine à double-dose dans leur algorithme de prise en charge de la PV et de la TE **(Tefferi et al., 2018a) (Tefferi et al., 2018a)**. Ainsi, au cours de la PV à faible risque, les auteurs suggèrent une prescription d'aspirine en cas de symptômes micro-vasculaires non contrôlés ou bien de patients à haut risque de thrombose, c'est-à-dire des patients avec des facteurs de risque cardio-vasculaires ou une leucocytose. Chez les patients à haut risque, ils suggèrent la prescription d'aspirine à double-dose en cas d'antécédent de thrombose artérielle. Au cours de la TE, les mêmes auteurs ont publié un algorithme de prise en charge basée sur le score pronostique IPSET-Thrombosis révisé, comportant donc 4 catégories : patients à très bas

risque, patients à bas risque, patients à risque intermédiaire et patients à haut risque. Dans cet article, les auteurs suggèrent un bénéfice de prescription d'aspirine à double-dose chez les patients à bas risque (selon IPSET-thrombosis, i.e patients sans antécédents de thrombose, âgés de moins de 60 ans mais avec mutation JAK2V617F) et avec facteurs de risque cardio-vasculaires, ainsi que chez les patients à haut risque (i.e patients avec antécédents de thrombose ou âgés de plus de 60 ans avec mutation JAK2V617F) et antécédent de thrombose artérielle.

Même si la prescription d'aspirine à double-dose semble tentante chez les patients à haut risque vasculaire, notamment artériel, devant les données physiopathologiques disponibles, on peut s'interroger sur les conséquences en terme de risque hémorragique d'une telle prescription. Ceci notamment devant les données disponibles avec le traitement par aspirine à faible dose.

B. Place des phlébotomies (ou saignées) au cours de la PV

Chez les patients avec PV, il a été clairement démontré un bénéfice à maintenir un taux d'hématocrite inférieur à 45%, en terme de survenue d'évènements cardio-vasculaires et de mortalité liée aux évènements cardio-vasculaires **(Marchioli et al., 2013)**. Chez les patients à bas et haut risque de thrombose, les phlébotomies ont donc leur place pour atteindre cet objectif.

C. Place des anti-vitamine K (AVK)

Les anti-vitamine K sont recommandés dans le traitement des épisodes thrombotiques veineux. En cas de survenue d'un épisode thrombotique veineux chez un patient avec NMP, se pose la question de la poursuite au long cours du traitement par AVK en prévention de la récidive de thrombose.

a. Dans les thromboses de tous territoires

De Stefano et ses co-auteurs ont publié en 2008 une étude rétrospective ayant inclus 494 patients avec TE ou PV et antécédent de thrombose artérielle (68%) ou veineuse (31%) ou les deux (1,4%). L'objectif de cette étude était d'analyser l'effet des traitements anticoagulant, antiagrégant plaquettaire et cytoréducteur sur la récidive de thrombose. Les auteurs montrent qu'un traitement cytoréducteur (CR) seul a un effet protecteur sur la récidive de thrombose (réduction du risque de 44%) et qu'une association avec un traitement anticoagulant ou anti-

agrégant plaquettaire a une meilleure efficacité qu'un traitement CR seul. Ils montrent également que la prescription d'un traitement par AVK au long cours a un effet protecteur sur la récidive de thrombose veineuse (réduction du risque de de 68% contre 58% pour l'aspirine), sans effet protecteur concernant la thrombose artérielle **(De Stefano et al., 2008)**. La même équipe publia en 2016 une étude analysant 206 patients avec TE ou PV et antécédent de TVP ou EP. Dans cette étude, les auteurs montrent qu'un traitement par AVK était protecteur vis-à-vis de la récurrence de thrombose (4,7 évènements/100 patients/an versus 8,9 évènements/100 patients/an), et qu'un traitement au long cours diminuait le risque de re-thrombose par rapport à un arrêt de traitement précoce (5,3 évènements/100 patients/an versus 12,8 évènements/100 patients/an). Ils ne retrouvaient pas de différence significative en terme de saignements. Enfin, en 2015, une autre équipe publia une analyse portant sur 150 patients avec NMP et antécédents de thrombose veineuse ou artérielle. Dans cette étude, les auteurs montraient que le taux de récurrence sous traitement par AVK était de 4,5 évènements/100 patients/an, cependant significativement inférieur au taux de récurrence retrouvé en cas d'arrêt du traitement par AVK (12 évènements/100 patients/an) **(Hernandez-Boluda et al., 2015)**.

b. Dans les thromboses splanchniques

Comme dit plus haut, les thromboses splanchniques sont des sites de prédilection de la thrombose veineuse au cours des NMP. Le traitement par AVK est la règle dans ces thromboses particulières, en présence ou en absence de NMP sous-jacente. Cependant, se pose également la question de la durée de l'anticoagulation. En effet, des études ont montré que le taux de récurrence en cas de NMP était bien plus important qu'en l'absence de NMP. Ainsi, Amitrano et ses co-auteurs ont montré que parmi 95 patients avec thrombose splanchnique, 12 présentaient une récurrence de thrombose au cours du suivi, dont 10 (70%) chez les patients avec NMP **(Amitrano et al., 2007)**. De Stefano et ses co-auteurs, dans une étude portant sur 181 patients avec NMP et thrombose splanchnique, ont montré que le taux de récurrence de thrombose était de 4,2 pour 100 patients-années (31 récurrences). En présence d'un traitement par AVK (85% des cas), le taux de re-thrombose était légèrement inférieur (3,9 évènements pour 100 patients par an), et bien moindre qu'en l'absence de traitement par AVK (7,2 évènements pour 100 patients par an). Cependant, il n'y avait pas de différence significative par rapport aux patients traités par aspirine (4,3 évènements pour 100 patients par an), ni par rapport aux patients ayant arrêté leur traitement par AVK précocement (5,4 évènements pour 100 patients par an) **(De Stefano et al., 2016)**.

Au total, ces études permettent d'émettre les conclusions suivantes :

- le traitement par AVK au long cours semble avoir une place dans la prévention de la récidive de la thrombose veineuse. Les données disponibles dans la thrombose artérielle sont moins claires, et dans cette indication l'aspirine semble aussi efficace que le traitement par AVK.

- le taux de récurrence de thrombose au niveau artériel et veineux n'est pas négligeable, même sous traitement par AVK au long cours, suggérant que des progrès thérapeutiques doivent être effectués.

- il semble licite de poursuivre le traitement par AVK au long cours en cas d'antécédent de thrombose splanchnique si le rapport bénéfice/risque le permet.

D. Place des anticoagulants oraux directs (AOD)

Les NMP sont considérées comme des cancers et il n'y a actuellement pas de recommandations pour la prescription d'anticoagulants oraux directs (AOD) en cas de thrombose associée aux cancers. Cependant, de plus en plus d'études étudient l'efficacité et la sûreté de la prescription d'AOD dans le domaine de l'oncologie **(Di Minno et al., 2017)(Vedovati et al., 2015)(Raskob et al., 2018)(Prins et al., 2014)**, et il probable que la prescription d'AOD au cours de la thrombose associée aux NMP augmente dans les années à venir. A ma connaissance, une seule étude a étudié la prescription d'AOD au cours des NMP. Dans cette étude, Ianotto et ses co-auteurs rapportent la prescription d'AOD chez 25 patients de leur cohorte (3,3%), prescrits dans un contexte de thrombose veineuse pour 12 d'entre eux et pour fibrillation auriculaire pour 13 d'entre eux. Parmi ces 25 patients avec NMP sous AOD, 1 patient a présenté une récidive de thrombose, tandis que 3 d'entre eux ont présenté un évènement hémorragique. Les auteurs ne retrouvaient pas de différence en terme d'efficacité et d'évènements hémorragiques entre les patients traités par AOD et les patients traités par AVK **(Ianotto et al., 2017)**. Même si la prescription d'AOD dans le cadre de thromboses veineuses et de NMP paraît possible, il paraît sûr de considérer à part les thromboses splanchniques, caractérisées par une physiopathologie particulière.

E. Les traitements cytoréducteurs

Chez les patients à haut risque de thrombose, c'est-à-dire ceux ayant un âge supérieur à 60 ans et/ou ceux ayant un antécédent de thrombose, il est recommandé de débuter un traitement cytoréducteur.

a. Au cours de la PV

1) Traitements de première ligne

L'hydroxyurée (HU) est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, exerçant sa cytotoxicité par inhibition de la synthèse d'ADN. Au cours de la PV, il constitue le traitement de première ligne. Une étude randomisée parue en 2011 a comparé l'hydroxyurée au pipobroman, autre traitement cytoréducteur, et montrait une supériorité en terme de survie et de transformation leucémique **(Kiladjian et al., 2011)(Najean and Rain, 1997)**. D'autres études non randomisées ont montré que l'hydroxyurée permettait une réduction du risque de thrombose au cours de la PV. Notamment, l'étude du Polycythemia Vera Study Group (PVSG) a montré que l'HU diminuait le risque de thrombose en comparaison aux phlébotomies seules, et le risque de transformation leucémique, en comparaison aux traitement par chlorambucil ou phosphore 32 (P32) **(Fruchtman et al., 1997)**. D'autres études ont d'ailleurs montré l'absence de lien entre le traitement par hydroxyurée et la transformation leucémique, initialement suspecté **(Finazzi et al., 2005)(Tatarsky and Sharon, 1997)**.

2) Traitements de seconde ligne

En cas de résistance ou d'intolérance à l'hydroxyurée, la prescription d'autres molécules est possible au cours de la PV : l'interféron-alpha, le busulfan et le ruxolitinib.

L'interféron-alpha pégylé (IFN) constitue un traitement efficace et sûr. Il a été montré que ce traitement induisait une réponse hématologique et moléculaire dans respectivement 76-95 et 18% des cas **(Quintas-Cardama et al., 2013)(Kiladjian et al., 2008)**. Du fait de problèmes de tolérance, ce traitement est généralement prescrit chez des patients jeunes.

Le busulfan est un agent alkylant qui peut être utilisé au cours de la PV. Des études anciennes **(Messinezy et al., 1985)**,**(D'Emilio et al., 1987)** ont montré une bonne efficacité de cytoréduction, sans risque leucémogène accru **(Tefferi et al., 2013)**. Il a été également montré

récemment qu'un traitement par busulfan chez des patients résistants à l'hydroxyurée entraînait une réponse hématologique chez la majorité des patients, et une réponse moléculaire chez une minorité d'entre eux **(Alvarez-Larrán et al., 2014)(Douglas et al., 2017)**. Ce traitement n'est cependant pas prescrit en France, et c'est généralement l'interféron ou le ruxolitinib qui est administré en seconde ligne de traitement.

Le ruxolitinib est un inhibiteur de JAK 1 et de JAK 2. Au cours de la PV, ce traitement a été comparé à la « meilleure thérapeutique disponible » en seconde ligne chez des patients résistants ou intolérants à l'HU avec splénomégalie (essai RESPONSE-1). Le critère de jugement principal était composite et comprenait le contrôle de l'hématocrite et l'effet sur la splénomégalie. Il était montré dans cette étude une supériorité du ruxolitinib mais avec une atteinte du critère principal chez seulement 21% des patients traités par ruxolitinib **(Vannucchi et al., 2015)**. Un suivi des patients à 80 semaines suggérait une supériorité en terme de prévention du risque thrombotique du ruxolitinib **(Verstovsek et al., 2016)**. De plus, une analyse exploratoire publiée en 2017 a montré une efficacité en terme de réponse moléculaire partielle voire complète **(Vannucchi et al., 2017)**. L'efficacité du ruxolitinib en seconde ligne a aussi été étudiée chez les patients avec PV sans splénomégalie, avec comme critère de jugement le contrôle de l'hématocrite : c'est l'essai RESPONSE-2. Ce critère était atteint chez 74% des patients traités par Ruxolitinib **(Passamonti et al., 2017)**. L'analyse à 80 semaines des patients inclus dans l'essai RESPONSE-2 montrait une réponse hématologique complète chez 18% des patients, contre 3% dans le bas « meilleur thérapie disponible » **(Griesshammer et al., 2018)**. Même si le ruxolitinib est une molécule intéressante dans le traitement de la PV, elle induit probablement une immuno-suppression importante, avec possiblement des réactivations virales **(Kirito et al., 2016)**.

b. Au cours de la TE

1) Traitements de première ligne

L'hydroxyurée est, comme au cours de la PV, la molécule principale utilisée en traitement de première ligne. Son effet bénéfique vis-à-vis du risque thrombotique a été montré par l'étude de Cortelazzo et ses co-auteurs, au cours de laquelle l'HU était comparé à un placebo **(Cortelazzo et al., 1995)**. L'HU a également été comparé à un autre traitement cytoréducteur, l'anagrélide, dans deux essais randomisés. Le premier, publié en 2005, montrait une supériorité de l'association HU + aspirine versus anagrélide + aspirine concernant la survenue de thrombose

artérielle, d'évènements hémorragiques et d'évolution en myélofibrose. L'anagrélide avait cependant une meilleure efficacité en terme de survenue de thrombose veineuse **(Harrison et al., 2005)**. Le second, essai de non-infériorité, a inclus 259 patients et ne retrouvait pas de différence entre l'HU et l'anagrélide concernant la survenue de thrombose artérielle, de thrombose veineuse, ni d'évènements hémorragiques **(Gisslinger et al., 2013)**.

Enfin, une étude récente a étudié de manière rétrospective des patients avec TE traités par anagrélide ou HU + aspirine. Les auteurs retrouvaient une efficacité supérieure de l'anagrélide en terme de survenue de thromboses veineuses et artérielles mineures. Cependant, il n'y avait pas de différence concernant les évènements thrombotiques majeurs entre les deux bras **(Dombi et al., 2016)**.

2) Traitements de seconde ligne

Les traitements de seconde ligne utilisables au cours de la TE sont l'interféron-alpha, le busulfan, et l'anagrélide.

Comme au cours de la PV, il a été montré que l'interféron induisait une réponse hématologique et moléculaire chez respectivement 70-80% et 10-20% des patients avec TE, particulièrement chez les patients avec mutation *CARL* **(Verger and Cassinat, 2015)(Quintas-Cardama et al., 2013)**.

Le busulfan peut également être utilisé chez les patients avec TE intolérants ou résistants à l'HU. Il a été montré que cette molécule induisait une bonne réponse hématologique**(Kuriakose et al., 2013)(Alvarez-Larrán et al., 2014)(Douglas et al., 2017)**.

Comme dit plus haut, l'anagrélide a été comparé à l'HU au cours de la TE, avec des résultats discordants **(Harrison et al., 2005)(Gisslinger et al., 2013)** en terme de prévention de la survenue de thrombose. A noter que des effets de toxicité cardiaque et rénale ont été retrouvés en cas de traitement par anagrélide au long cours **(Storen and Tefferi, 2001)(Engel et al., 2005)(Mazzucconi et al., 2004)**.

De manière intéressante, le traitement par ruxolitinib a été récemment étudié au cours de la TE, chez des patients intolérants ou résistants à l'HU (essai MAJIC-ET). Il n'a pas été retrouvé de bénéfice en terme de survenue de thrombose, d'évènements hémorragiques, ou de transformation chez les patients traités par ruxolitinib en comparaison traités par « le meilleur traitement disponible » **(Harrison et al., 2017)**.

F. Algorithmes de prise en charge des patients avec TE et PV

Les modalités de traitement au cours de ces deux NMP sont *a priori* simples :

- au cours de la PV : aspirine + maintien de l'hématocrite en-dessous de 45% et cytoréduction si patients à haut-risque
- au cours de la TE : aspirine et cytoréduction si patients à haut-risque

Cependant, à la vue des données décrites précédemment, des auteurs **(Tefferi et al., 2018a)(Tefferi et al., 2018b)** préconisent des prises en charge plus « fines », notamment au cours de la thrombocytémie essentielle, adaptées aux scores pronostiques **(Figure 15 et Figure 16).**

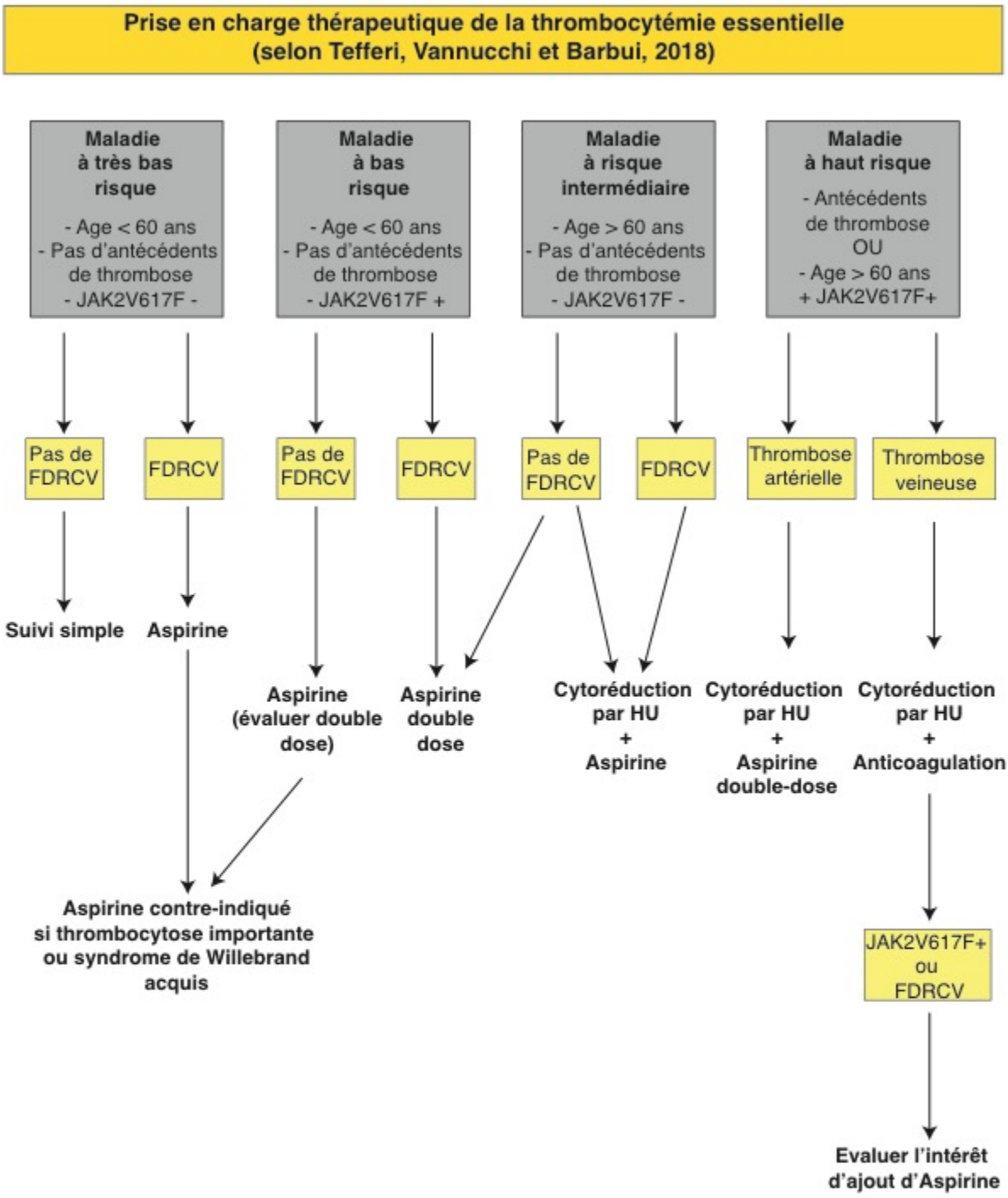


Figure 15 : Algorithme de prise en charge de la Thrombocytémie essentielle (TE)

Ce schéma reprend celui publié dans l'article « Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018 » de Tefferi, Vannucchi et Barbui (Blood Cancer Journal, 2018). Cet algorithme est basé sur le score pronostique de thrombose « IPSET-Thrombosis » (International Prognostic Score for Essential Thrombocythemia) développé par ses mêmes auteurs (« Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization–essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis)», Blood, 2012).

Abréviations : HU, hydroxyurée ; FDRCV, facteurs de risque cardio-vasculaire.

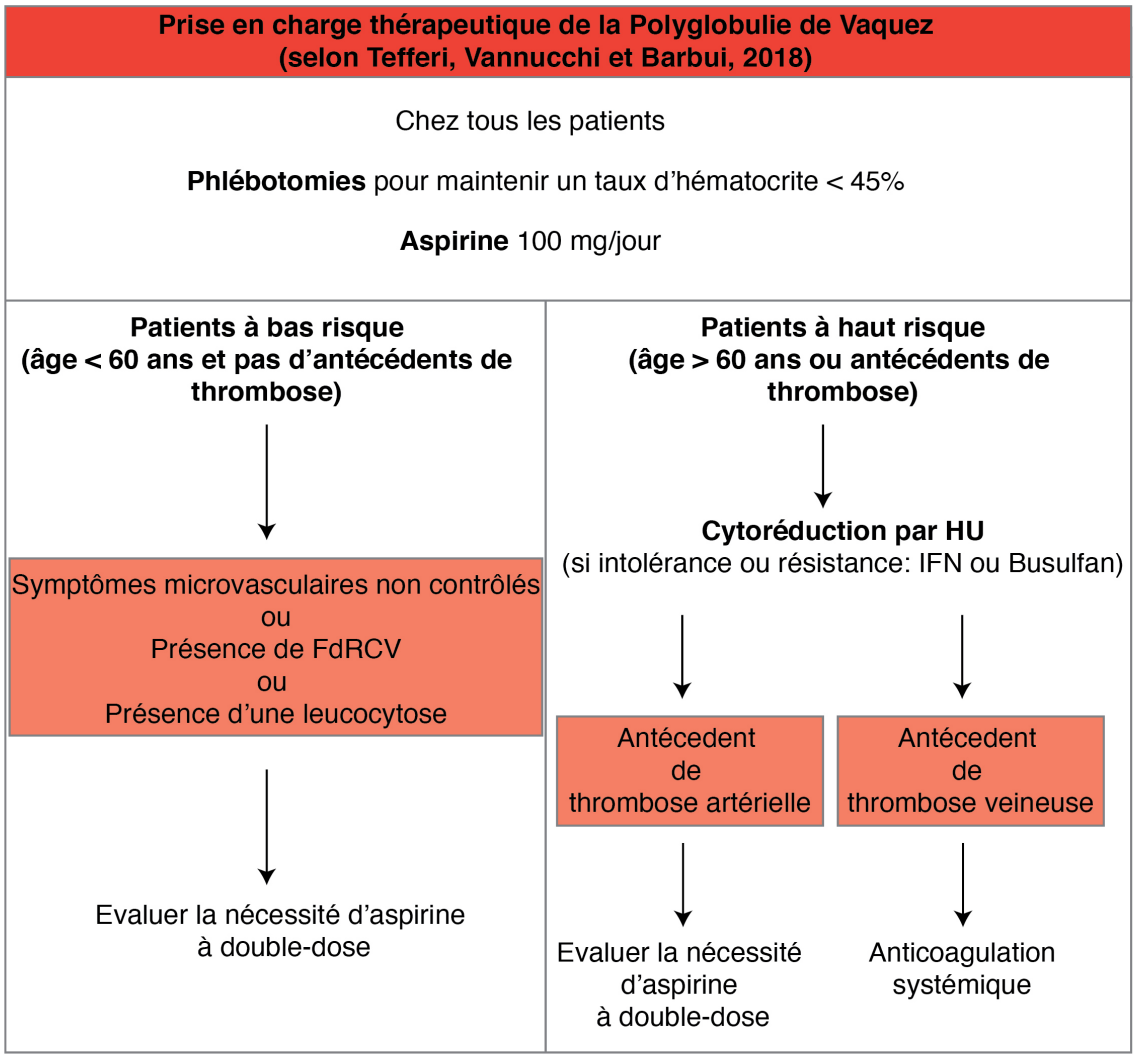


Figure 16 : Algorithme de prise en charge de la Polyglobulie de Vaquez (PV)
Ce schéma reprend celui publié dans l'article « Polycythemia vera treatment algorithm 2018 » de Tefferi, Vannucchi et Barbui (Blood Cancer Journal, 2018).
Abréviation : HU, hydroxyurée.

3ème partie : Les cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F dans les NMP BCR-ABL négatif

Dans cette troisième partie, j'effectuerai un rappel sur la vasculogénèse embryonnaire et en post-natal avant de présenter les principales études portant sur les cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F.

En effet, la présence de cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F chez les patients avec NMP BCR-ABL- a été démontrée par trois équipes indépendantes.

I. Vasculogénèse et hématopoïèse

A. Chez l'embryon

a. Vasculogénèse embryonnaire

Le système cardio-vasculaire est le premier système fonctionnel à se mettre en place chez l'embryon vertébré aux alentours de 7,5 jours de développement. Les premiers constituants de ce système vasculaire, les cellules endothéliales et les cellules hématopoiétiques, principalement des progéniteurs érythroides, se mettent en place de manière parallèle, spatialement et d'un point de vue temporel, à partir du mésoderme du sac vitellin. Les premières structures à voir le jour sont des îlots sanguins, clusters de cellules épithéliales, dont les cellules les plus « internes » vont donner naissance aux cellules hématopoïétiques, et les cellules les plus « externes » aux cellules endothéliales. Le rapprochement entre elles des cellules endothéliales va entraîner la formation de tubes endothéliaux primitifs. Une fois la vascularisation primitive du sac vitellin mise en place, les précurseurs angioblastiques vont migrer en son sein puis s'agréger afin de former les structures vasculaires suivantes : aorte dorsale, veines cardinales, artères et veines du sac vitellin. Une fois la circulation sanguine établie, les plexus vasculaires primitifs vont se transformer en un réseau organisé d'artères, de veines et de capillaires.

b. *Hématopoïèse embryonnaire*

1) *L'hématopoïèse primitive*

Les premières cellules hématopoiétiques à apparaître aux alentours de 7 jours de vie sont les progéniteurs érythroides sus-cités, qui vont coloniser le plexus vasculaire primitif dès les premiers battements cardiaques : c'est l'hématopoïèse primitive.

2) *L'hématopoïèse définitive*

Rapidement après la survenue de l'hématopoïèse primitive, une seconde vague d'hématopoïèse pluripotente, appelée définitive, va se mettre en place avec un « site de production » qui migre au fur et à mesure du développement. Elle débute au niveau du sac vitellin à E8,25, puis au niveau du placenta à E9,5, et enfin au niveau de la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) à E10. A E12, c'est le foie fœtal qui devient le lieu principal de l'hématopoïèse, avant que la moelle osseuse ne prenne le relais, définitif cette fois-ci.

3) *La notion d'hémangioblaste ou endothélium hémogénique*

Au cours de l'hématopoïèse primitive, l'apparition simultanée de cellules endothéliales et hématopoiétiques a donné lieu à deux théories : la première suggérant que ces deux lignées cellulaires émergent d'un progéniteur commun bipotent (ou hémangioblaste) **(Choi et al., 1998)(Fehling et al., 2003)**, la seconde suggérant que ces deux lignées émergent indépendamment à partir de progéniteurs mésodermiques au cours de la gastrulation **(Kinder et al., 1999)**. A ce jour, le débat entre ces deux théories n'est pas résolu.

Par contre, au cours de l'hématopoïèse définitive, il est admis que les progéniteurs hématopoiétiques multipotents émergent de cellules endothéliales, principalement au niveau de l'AGM. Ces cellules endothéliales, décrites il y a plus d'un siècle **(Sabin, 2002)**, étaient appelées hémangioblastes, alors qu'aujourd'hui on parle plus volontiers d'endothélium hémogénique. Il a par la suite été permis de le démontrer grâce des études de « traçage de lignées » (*lineage tracing*), d'imagerie in vivo et d'analyses de clonalité *in vitro*. Pour exemple, il a été montré que des cellules VE-Cadhérine positif (marqueur endothélial spécifique) donnaient naissance au niveau de l'AGM à des cellules hématopoiétiques de l'ensemble des lignées **(Zovein et al., 2008)**. L'apport des méthodes d'imagerie dynamique en temps réel a permis, chez le poisson zèbre **(Kissa and Herbomel, 2010)** et la souris **(Boisset et al., 2010)**, la visualisation de la formation de ces cellules hématopoiétiques au niveau de l'AGM. L'endothélium hémogénique

constitue une sous-population rare de cellules endothéliales de l'AGM (environ 2%) **(Hirschi, 2012)** avec, sur le plan phénotypique, des capacités d'efflux de colorant (population nommée *side-population* ou sp) et une positivité des antigènes Flk1 et ckit, une négativité de l'antigène CD45 (cellules Flk1+ckit+CD45-) **(Nadin et al., 2003)**. La transition endothélio-hématopoiétique permettra de donner naissance à des cellules hématopoiétiques Flk1-ckit+CD45+ qui possèdent des capacités de colonisation du foie fœtal **(Medvinsky and Dzierzak, 1996)**.

B. En post-natal et chez l'adulte

Il a longtemps été admis que la vascularisation post-natale résultait exclusivement de la prolifération, de la migration et du remodelage de cellules endothéliales (CE) pleinement différenciées. Cependant, un article paru en 1997 dans *Science* a démontré la présence de progéniteurs endothéliaux circulants dans le sang périphérique de patients adultes, battant en brèche ce paradigme **(Asahara et al., 1997)**.

Dans ce chapitre, j'effectuerai quelques rappels sur la physiologie générale des progéniteurs endothéliaux avant de décrire les différents types de progéniteurs endothéliaux décrits chez l'homme.

a. Physiologie des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC)

En 1997, Asahara et ses collègues ont isolé à partir de cellules mononuclées du sang périphérique de patients adultes, des cellules exprimant un antigène hématopoiétique, le CD34, et un antigène endothélial, le Flk1 (ou VEGFR2). Dans leur article, les auteurs montrent que ces cellules peuvent se différencier *in vitro* en cellules endothéliales matures, avec expression de marqueurs endothelial-spécifique (CD31, Tie2), mais également former des structures capillaires. *In vivo*, les auteurs montrent que ces cellules participent à la néoangiogénèse dans un modèle d'ischémie de patte de souris. Il s'agissait de la première preuve de l'existence de progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) en post-natal **(Asahara et al., 1997)** et donc la possibilité de survenue de vasculogénèse en post-natal. A noter que l'antigène CD34 étant également exprimé à un faible niveau au niveau des cellules endothéliales, des études ultérieures ont cherché à mettre en évidence des marqueurs phénotypiques supplémentaires des PEC, non exprimés par les cellules endothéliales matures. L'équipe de Peichev et de ses co-auteurs a notamment montré que les PEC exprimaient le CD34, mais également le VEGFR-2 et le CD133 (ou AC133), définissant une population CD34+VEGFR2+AC133+, dotée de capacités de

formation de colonies de cellules endothéliales *in vitro*, et de colonisation *in vivo* **(Peichev et al., 2000)**.

1) Rôle des PEC dans la néovascularisation

Les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) sont mobilisés à partir de la moelle osseuse **(Asahara et al., 1999)(Lin et al., 2000)** pour se rendre au niveau de sites d'ischémie **(Asahara et al., 1999)** et participer ainsi à la néovascularisation. Cette participation à la néovascularisation a été montré chez la souris dans différents modèles d'ischémie (infarctus du myocarde, ischémie de patte) au cours desquels l'injection de PEC expandus ex-vivo permettait une amélioration des lésions ischémiques **(Kawamoto et al., 2001)(Murohara et al., 2000)**, ainsi qu'au cours des phénomènes d'angiogenèse tumorale **(Lyden et al., 2001)**. Les PEC, une fois mobilisés à partir de la moelle osseuse, vont incorporer la paroi des nouveaux vaisseaux **(Jackson et al., 2001)(Lyden et al., 2001)(Crosby et al., 2000)** mais également relarguer des facteurs pro-angiogéniques permettant de favoriser la néoangiogénèse de manière paracrine **(De Palma et al., 2003)**. Chez l'homme, le rôle des PEC dans la néovascularisation a été étudié de manière extensive. Il a notamment été retrouvé une augmentation transitoire des PEC lors de différents processus pathologiques : infarctus du myocarde **(Shintani et al., 2001)**, réalisation d'un pontage aorto-coronarien **(Scheubel et al., 2003)** ou brulures étendues **(Gill et al., 2001)**.

2) Mobilisation, migration et différenciation des PEC

La mobilisation des PEC à partir de la moelle osseuse est déclenchée par la survenue d'une ischémie, menant à une augmentation des taux de VEGF (*vascular endothelial growth factor*) puis de CXCL12 (*C-X-C motif chemokine 12*) et de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*). VEGF et SDF1 vont induire la mobilisation des PEC via un mécanisme dépendant d'une métalloprotéinase de matrice, la MMP9 (*matrix metalloproteinase-9*), une métalloprotéinase de matrice **(Lee et al., 2000)(Pillarisetti and Gupta, 2001)(Heissig et al., 2002)(Heissig et al., 2002)**. D'autres cytokines sont en mesure d'augmenter le nombre de PEC : G-CSF (granulocyte colony stimulating factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) **(Takahashi et al., 1999)** ou érythropoïétine (EPO) **(Bahlmann et al., 2003)**. Enfin, il a été montré que les statines **(Dimmeler et al., 2001)** ou l'exercice physique **(Laufs et al., 2004)** étaient également en mesure d'induire une augmentation du nombre de PEC circulants.

Une fois mobilisés, les PEC migrent jusqu'aux sites d'ischémie via un mécanisme de *homing* médié par des gradients de chimiokines sécrétées par les tissus lésés (SDF1/CXCR4, IL8/CXCR2 ou IGF2/IGF2R **(Maeng et al., 2009)**. Les PEC vont adhérer aux cellules endothéliales activées par l'ischémie puis effectuer une transmigration au niveau de la monocouche endothéliale **(Vajkoczy et al., 2003)**. L'adhésion des PEC aux cellules endothéliales se fait grâce à des molécules d'adhésion (E-Selectine, P-Selectine, ICAM1) et des intégrines, principalement celles de la famille des ß2-intégrines et des α4ß1-intégrines **(Kollet et al., 2001)(Peled et al., 1999)**.

Le processus de différenciation des PEC en CE matures est complexe. La première étape est l'adhésion des PEC aux composants de la matrice extracellulaire via des intégrines. Notamment, l'intégrine α5ß1 semble essentielle dans les étapes initiales de différenciation des PEC **(Wijelath et al., 2004)**. Une fois stabilisés, les PEC vont proliférer en réponse à différents facteurs de croissance, notamment le VEGF, le PDGF (*platelet-derived growth factor*) ou le SDF1 (*stromal cell derived factor 1*) **(Hildbrand et al., 2004)**.

Enfin, la maturation et l'acquisition d'un phénotype endothélial mature se fait sous la dépendance principale d'un facteur de transcription, HOXA9, impliqué dans la régulation de l'expression de gènes codant les protéines e-NOS, VEGFR2 ou VE-Cadherine **(Rössig et al., 2005) (Figure 17)**.

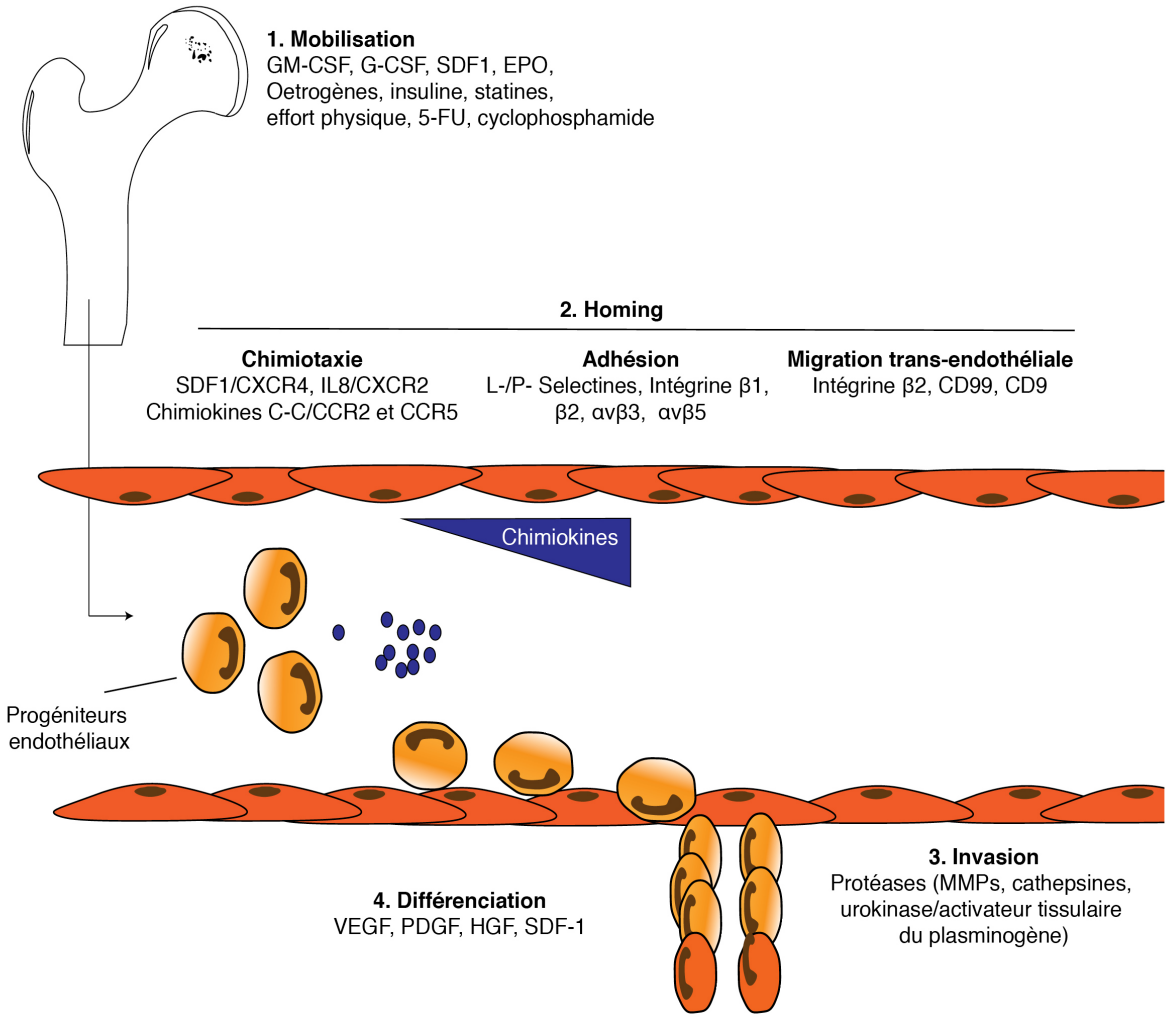


Figure 17 : Mécanismes participant à la participation des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC)dans la vasculogénèse post-natale

La mobilisation des PEC à partir de la moelle osseuse s'effectue suite à des stimuli divers (chimiokines, chimiothérapie, médicaments, efforts physiques, ...). Les PEC intègrent la circulation sanguine puis, dans un processus de homing, migrent au site d'ischémie/inflammation. Là, elles adhérent aux cellules endothéliales puis entrent dans un processus de différenciation puis d'invasion, permettant la mise en place de néo-vaisseaux.

Figure adaptée de la figure de Caiado et co-auteurs dans l'article « Endothelial progenitors and integrins : adhesive needs », Fibrogenesis Tissue Repair, 2012, et de la figure de Silvestre et co-auteurs dans l'article « Post-ischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications », Physiological reviews, 2013.

b. Plusieurs types de progéniteurs endothéliaux circulants, avec des origines différentes

En 2004, Hur et ses co-auteurs ont proposé une classification des progéniteurs endothéliaux circulants chez l'homme en fonction du délai d'apparition de ces cellules en culture, classant ces progéniteurs en progéniteurs endothéliaux précoces, ou CFU-EC (*colony-forming unit endothelial cell*), et en progéniteurs endothéliaux tardifs, ou ECFC (*endothelial colony forming cell*) **(Hur et al., 2004)**. Cette équipe, ainsi que l'équipe de Yoder, en 2004 puis en 2007, ont effectué une caractérisation précise de ces deux types de progéniteurs endothéliaux, permettant la mise en évidence de différences importantes entre CFU-EC et ECFC **(Ingram et al., 2004)(Yoder et al., 2007) (Tableau 1)**.

	PEC précoces	**PEC tardifs**
Nomenclature	EPC, CFU-EC	EPC, ECFC, late EPC
Délai d'apparition en culture	4-7 jours	> 7 jours
Phénotype	vWF, VEGFR-2, VE-Cadhérine, CD31, CD14, CD45	CD31, CD34, CD105, CD146, VE-Cadhérine, VEGFR-2
Prolifération	+/-	+++
Tubes en matrigel	-	+++
Sécrétion de cytokines	+++	-
Potentiel angiogénique in vivo	+++	+++
Origine	Hématopoiétique (monocytaire)	Non hématopoiétique

Tableau 1 : Comparatif des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) précoces et tardifs
Abréviations : PEC, progéniteurs endothéliaux précoces ; EPC, endothelial progenitor cells ; CFU-EC, colony-formming-unit endothelial cell ; ECFC, endothelial colony forming cell ; vWF, von Willebrand factor ; VEGFR-2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

1) Les progéniteurs endothéliaux circulants précoces ou CFU-EC

i. Isolement par technique de culture

La technique d'isolement des PEC précoces, ou CFU-EC, a été décrite initialement par Hill en 2003 **(Hill et al., 2003)**. Les cellules mononuclées (CMN) du sang périphérique sont isolées à partir d'un gradient de Ficoll, puis ensemencées dans un milieu dédié dans des puits « coatés » avec de la fibronectine. Après 48 heures, les cellules non adhérentes sont transférées dans d'autres puits également « coatés » avec de la fibronectine. Les colonies de CFU-EC

apparaissent de manière précoce, 4 à 6 jours après le début de la culture, puis sont dénombrées. Visualisées au microscope optique, ce sont des colonies formées d'un centre de cellules arrondies entourées de cellules fusiformes.

ii. Caractéristiques et origine des CFU-EC

Les CFU-EC expriment des marqueurs d'immaturité (CD34), des marqueurs hématopoiétiques (CD11, CD14, CD45) et des marqueurs endothéliaux (CD31, VEGF-R, vWF). Elles sont caractérisées par un faible potentiel prolifératif *in vitro* et *in vivo*, n'ont pas de capacités clonogéniques, ne peuvent former de tubes en matrigel (Hur et al., 2004)**(Yoder et al., 2007)**. Elles peuvent cependant s'intégrer dans une monocouche d'HUVEC, de manière moins importante que les ECFC (Hur et al., 2004)**.** Leurs propriétés pro-angiogéniques s'exercent principalement via la sécrétion de cytokines pro-angiogéniques (VEGF, interleukine-8) *in vivo* **(Hur et al., 2004)**. Leur origine est hématopoiétique-monocytaire et il est admis que les CFU-EC sont en fait des cellules hématopoiétiques à potentiel angiogénique, et non de véritables progéniteurs endothéliaux, comme le sont les ECFC. En faveur d'une origine monocytaire des CFU-EC : l'expression à leur surface de marqueurs monocytaires, leur différenciation possible en macrophages, et leurs capacités de phagocytose de bactéries (*Escherichia Coli*) **(Yoder et al., 2007)**.

2) Les progéniteurs endothéliaux circulants tardifs ou ECFC

i. Isolement par technique de culture

Contrairement à l'isolement des CFU-EC, pour isoler des ECFC, les CMN du sang sont mises en culture dans des puits « coatés » avec du collagène de type I, et non de la fibronectine. Le milieu utilisé est un milieu endothélial-spécifique, supplémenté en différents facteurs de croissance, comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), le FGF (*fibroblast growth factor*), l'IGF1 (*insulin-like growth factor*), ou l'EGF (*epidermal growth factor*). A J1 de culture, les cellules non-adhérentes sont retirées du puits. Un changement de milieu est effectué toutes les 48 à 72 heures et les colonies d'ECFC apparaissent entre J10 et J21 **(Lin et al., 2000)(Au et al., 2007)**. Les colonies d'ECFC forment un groupement de cellules arrondies, adhérentes. Du fait de leurs capacités clonogéniques, un isolement de ces ECFC est possible via l'utilisation de puits de clonage. Les colonies sont isolées puis transférées dans d'autres puits afin de procéder à une amplification. De nombreuses variantes de culture des ECFC ont été décrites : variation du

nombre de CMN mises en culture, du milieu de culture, de la matrice utilisée, des cinétiques de changement de milieu **(Case et al., 2007)(Bompais et al., 2004)(Tura et al., 2010)**.

ii. Caractéristiques et origine des ECFC

Les PEC tardifs ou ECFC apparaissent en culture tardivement, comme décrit initialement par Hur **(Hur et al., 2004)**. Contrairement aux CFU-EC, les ECFC n'expriment pas de marqueurs hématopoiétiques (CD14, CD45) mais de nombreux marqueurs endothéliaux (CD31, CD105, CD106, VE-Cadherine, KDR ou VEGFR-2, vWF). De plus, ce qui n'est pas le cas des CFU-EC, les ECFC ont des propriétés clonogéniques, qui sont cependant hétérogènes. En effet, il a été montré qu'il existait des ECFC à fort potentiel clonogénique (*high proliferative potential* ou HPP-ECFC) et d'autres à faible potentiel clonogénique (*low proliferative potential* ou LPP-ECFC**) (Ingram et al., 2004)(Yoder et al., 2007)** : les HPP-ECFC ont la capacité de donner naissance à des colonies de cellules adhérentes après repiquage, ce qui n'est pas le cas des LPP-ECFC. *In vivo*, les ECFC sont également capables de former des néo-vaisseaux dans des souris immuno-déficientes, ce qui n'est pas le cas des CFU-EC **(Melero-Martin et al., 2007)(Melero-Martin et al., 2008)(Yoder et al., 2007)(Yoder, 2010)**. L'ensemble de ces propriétés confère aux ECFC le statut de véritable progéniteur endothélial, cellule ayant des propriétés angiogéniques et de prolifération.

Alors qu'il est aujourd'hui établi que les CFU-EC ont une origine hématopoiétique, l'origine des ECFC est controversée : cellule dérivée d'un hémangioblaste ou cellule d'origine endothéliale seulement.

La mise en lumière de l'existence de différents types de progéniteurs endothéliaux circulants depuis 2004 doit mener à une analyse précautionneuse des résultats des études antérieures à cette date ayant pour but la mise en évidence de l'existence d'un hémangioblaste chez l'homme. En effet, l'absence de connaissance de l'existence des CFU-EC, cellule hématopoiétique à potentiel endothélial, a pu faire conclure à l'existence d'un hémangioblaste en post-natal, alors qu'une cellule CFU-EC, capable de s'intégrer dans le compartiment endothélial peut éventuellement mimer ce phénomène.

c. ***Progéniteurs endothéliaux résidents***

Par oppsotion aux progéniteurs endothéliaux circulants, il est important de noter que des cellules progénitrices endothéliales peuvent se trouver au sein des vaisseaux. Alors que les cellules endothéliales veineuses ou artérielles issues de sang de cordon (*human venous*

endothelial cell ou HUVEC ou *human arterial endothelial cell* ou HAEC) permettent l'étude de cellules endothéliales dites matures, il a été montré qu'au sein des HUVEC et des HAEC, résidaient des cellules endothéliales progénitrices dotées de capacités de prolifération et avec un potentiel clonogénique important **(Ingram et al., 2005a)(Ingram et al., 2005b)**. Cette observation rejoint une observation bien plus ancienne, de Schwartz et Benditt, qui notaient en 1976 la présence de clusters de cellules endothéliales à fort potentiel prolifératif situés au sein de cellules endothéliales matures d'aortes de rats **(Schwartz and Benditt, 1976)**. La présence de cellules endothéliales résidentes à capacités de prolifération augmentées a ainsi été relevée au sein de cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires de rat (*pulmonary microvascular endothelial cell* ou PMVEC) et de cellules artérielles pulmonaires de rat (*pulmonary arterial endothelial cell* ou PAEC). Dans leur étude, les auteurs montraient que les PMVEC contenaient une population importante de cellules endothéliales à fort potentiel prolifératif (*endothelial progenitor cell* ou EPC), ce qui n'était pas le cas de la population de PAEC **(Alvarez et al., 2008)**. Plus récemment, d'autres études ont confirmé la présence de cellules progénitrices endothéliales situées au sein de cellules endothéliales matures **(Fang et al., 2012)(Yu et al., 2016)(Naito et al., 2012)**. Enfin, il a été montré récemment que cette capacité clonale des cellules endothéliales résidentes au sein des vaisseaux était augmentée dans des conditions d'ischémie et d'hypoxie endothéliale, permettant une « réponse » à ces stimuli et donc la mise en place d'une néoangiogénèse via ce mécanisme **(Manavski et al., 2018)**.

Au total, il semble donc exister chez l'homme des progéniteurs endothéliaux résidents, et des progéniteurs endothéliaux circulants comprenant en leur sein les CFU-EC, d'origine hématopoiétique et sans réelle capacité angiogénique et les ECFC, véritables progéniteurs endothéliaux capables de former des néovaisseaux.

II. Il existe des cellules endothéliales porteuses de la mutation JAK2V617F

A. La recherche de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales au cours des NMP JAK2V617F

Plusieurs approches ont conduit à la mise en évidence de CE JAK2V617F : des approches *in situ*, avec recherche de JAK2V617F directement dans des CE microdisséquées et des approches de cultures de progéniteurs endothéliaux.

a. Recherche de la mutation JAK2V167F dans des cellules endothéliales matures par technique de microdissection laser

Deux équipes ont recherché la présence de la mutation JAK2V617F dans des cellules endothéliales matures par technique de microdissection laser : l'équipe de Sozer **(Sozer et al., 2009a)** et l'équipe de Rosti **(Rosti et al., 2013)**.

En 2009, Sozer et ses co-auteurs publièrent un article s'intéressant à la recherche de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales de patients avec NMP. 3 patients avec polyglobulie de Vaquez et syndrome de Budd-Chiari étaient étudiés. Utilisant une technique de micro-dissection laser, les cellules endothéliales de veinules hépatiques étaient isolées et une PCR à la recherche de *JAK2*V617F réalisée. Chez 2 des 3 patients, les auteurs retrouvaient la mutation JAK2V617F à l'état homozygote dans les CE. Les auteurs confirmaient la nature endothéliale des cellules analysés en mettant en évidence la présence de transcrits endothéliaux-spécifique (VE-Cadherine, VEGFR-R2, vWF) et l'absence de transcrits spécifiques des cellules hématopoiétiques (CD45 et CD14) dans les cellules endothéliales isolées. Cette étude démontre que certains patients avec NMP JAK2V617F peuvent être porteurs de la mutation JAK2V617F dans des CE au niveau d'un territoire vasculaire spécifique (le foie), et suggère la possible implication de ces CE JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose (patients avec antécédent de syndrome de Budd-Chiari) **(Sozer et al., 2009a)**.

La recherche de la mutation JAK2V617F dans des cellules endothéliales matures a de nouveau été effectuée en 2013 avec l'article publié par Rosti et ses co-auteurs. Dans cette étude, les auteurs ont recruté 18 patients avec myélofibrose primitive. Parmi ces 18 patients, des échantillons de rate ont été analysés pour 8 patients, avec réalisation d'une micro-dissection laser des cellules endothéliales. En utilisant un marquage CD31 des CE, 24 échantillons ont été analysés et 17/24 échantillons étaient positifs pour la mutation JAK2V617F. De manière

intéressante, les auteurs ont montré que les 8 patients analysés avaient au moins 1 échantillon positif pour JAK2V617F, et que 6/8 patients avaient au moins 1 échantillon positif pour JAK2WT, témoignant du caractère hétérogène de la présence de JAK2V617F au niveau des cellules endothéliales. Pour 14 patients, les cellules endothéliales isolées ont été mises en culture, et l'obtention de cellules endothéliales confluentes fut réussie pour 10 patients. Parmi les cellules endothéliales matures de ces 10 patients, 6 étaient porteuses de la mutation JAK2V617F. Pour s'assurer de l'absence de contamination par des cellules hématopoiétiques, les auteurs ont confirmé par immunohistochimie la présence de protéines spécifiques de la lignée endothéliale (VE-Cadherine, CD144, vWF) et l'absence de protéines spécifiques de la lignée hématopoiétique (CD45) chez 5/6 patients. Enfin, chez 1 patient, la mutation JAK2V617F était présente dans les CE des capillaires spléniques (analysées après micro-dissection laser) et dans les CE isolées de la veine splénique puis mises en culture. Cette étude confirme que la mutation JAK2V617F peut être présente dans les cellules endothéliales matures de patients avec NMP JAK2V617F, au niveau des cellules endothéliales spléniques de patients avec MFP. Les auteurs soulignent cependant la difficulté d'expliquer la survenue de cette mutation dans les CE, d'autant plus qu'ils n'ont pu la mettre en évidence dans les ECFC obtenues chez ces patients **(Rosti et al., 2013)**.

b. Recherche de la mutation JAK2V617F dans des progéniteurs endothéliaux circulants

En 2006, une équipe identifia pour la première fois la mutation JAK2V617F dans des colonies de cellules endothéliales dérivées de progéniteurs endothéliaux d'un patient avec polyglobulie de Vaquez JAK2V617F-positif, suggérant la présence d'un progéniteur commun au cours de ces maladies **(Oppliger Leibundgut et al., 2006)**.

En 2007, l'équipe de Yoder, dans un article définissant les propriétés respectives des CFU-EC et ECFC, étudia également les ECFC de 11 patients avec PV JAK2V617F-positif. 89 ECFC étaient analysées, dont 3 étaient porteuses de la mutation JAK2V617F, toutes obtenues à partir du même patient **(Yoder et al., 2007)**.

En 2009, une autre équipe publia des résultats concernant la recherche de marqueurs de clonalité dans les progéniteurs endothéliaux de patients avec NMP. Piaggio et ses co-auteurs étudièrent les progéniteurs endothéliaux précoces (ou CFU-EC) et tardifs (ou ECFC) isolés du sang circulant de patients avec LMC BCR-ABL et NMP JAK2V617F-positif. Chez les patients avec LMC, la recherche du transcrit spécifique p210 par RT-qPCR (quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction) était positive dans les CFU-EC, mais dans aucune ECFC (analyse de 51 ECFC). Chez 7 patients avec LMC, la recherche du transcrit de fusion BCR-ABL par technique de FISH dans les ECFC était également négative. Concernant les

patients avec NMP et mutation JAK2V617F, 75 ECFC isolées à partir de 57 patients furent analysées, sans mettre en évidence de mutation JAK2V617F. Au contraire, la mutation JAK2V617F était présente dans toutes les CFU-EC. Pour les auteurs, ces résultats confirmaient que les CFU-EC étaient des progéniteurs endothéliaux dérivés de la lignée hématopoiétique et faisant partie du clone malin au cours des NMP. Cependant, ces résultats, indiquant l'absence de mutation JAK2V617F ou de transcrit de fusion BCR-ABL au niveau des ECFC, ne confirmaient pas les résultats publiés par Oppliger Leibungdut en 2006, et s'inscrivaient contre l'hypothèse de l'existence d'un hémangioblaste au cours de ces maladies **(Piaggio et al., 2009)**.

Deux années plus tard, l'équipe de Téofili et de ses co-auteurs a également recherché la mutation JAK2V617F dans les ECFC de patients avec NMP, avec des résultats contradictoires avec ceux de l'équipe de Piaggio et de l'équipe de Yoder. Dans cette étude, 42 patients avec NMP JAK2V617F furent inclus, et les ECFC de 22 patients analysées. Parmi les 22 patients, 5 étaient porteurs de la mutation JAK2V617F au niveau des ECFC. De manière intéressante, ces 5 patients avaient des antécédents thrombotiques, ce qui n'était pas le cas des autres patients, suggérant une participation des CE avec mutation JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose au cours de ces maladies. De plus, les auteurs montraient une activation de la voie JAK2/STAT dans les ECFC avec mutation JAK2V617F (via l'étude de l'expression de p-STAT3 et p-STAT5 en Western-Blot), et une augmentation de l'adhésion de cellules mononuclées en présence d'ECFC JAK2V617F en comparaison aux ECFC JAK2WT. Cette étude démontre que des patients avec NMP JAK2V617F peuvent être porteurs de la mutation JAK2V617F dans les ECFC, argument en faveur d'une cellule commune aux deux lignées hématopoiétique et endothéliale, dans laquelle surviendrait la mutation JAK2V617F. Les auteurs suggèrent de plus une participation de ces ECFC JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose : présence uniquement chez des patients aux antécédents de thrombose, caractère pro-adhésif des ECFC JAK2V617F *in vitro* **(Teofili et al., 2011)**.

En 2013, comme dit plus haut, l'équipe de Rosti et al. a également recherché la mutation JAK2V167F dans les ECFC de patients avec NMP : les auteurs ont analysé 23 colonies d'ECFC obtenues à partir des cellules mononuclées de la rate de 8 patients et aucune de ces ECFC n'était porteuse de la mutation JAK2V617F **(Rosti et al., 2013)**.

Enfin, la possibilité de survenue de la mutation JAK2V617F dans les ECFC de patients avec NMP JAK2V617F et antécédents thrombotiques fut récemment confirmée par une étude parue en 2016. Dans cette étude, 7 patients avec antécédent de syndrome de Budd-Chiari et présence de JAK2V617F au niveau sanguin furent étudiés. 2/7 patients étaient atteints de MFP. Les 5 autres patients n'avaient pas développé de néoplasie myéloprolifération. Les ECFC étaient

obtenues à partir de prélèvements de moelle osseuse. Parmi les 5 patients pour lesquels l'analyse a été réalisable, 4 patients étaient porteurs de la mutation JAK2V617F dans leurs ECFC **(Helman et al., 2016) (Figure 18)**.

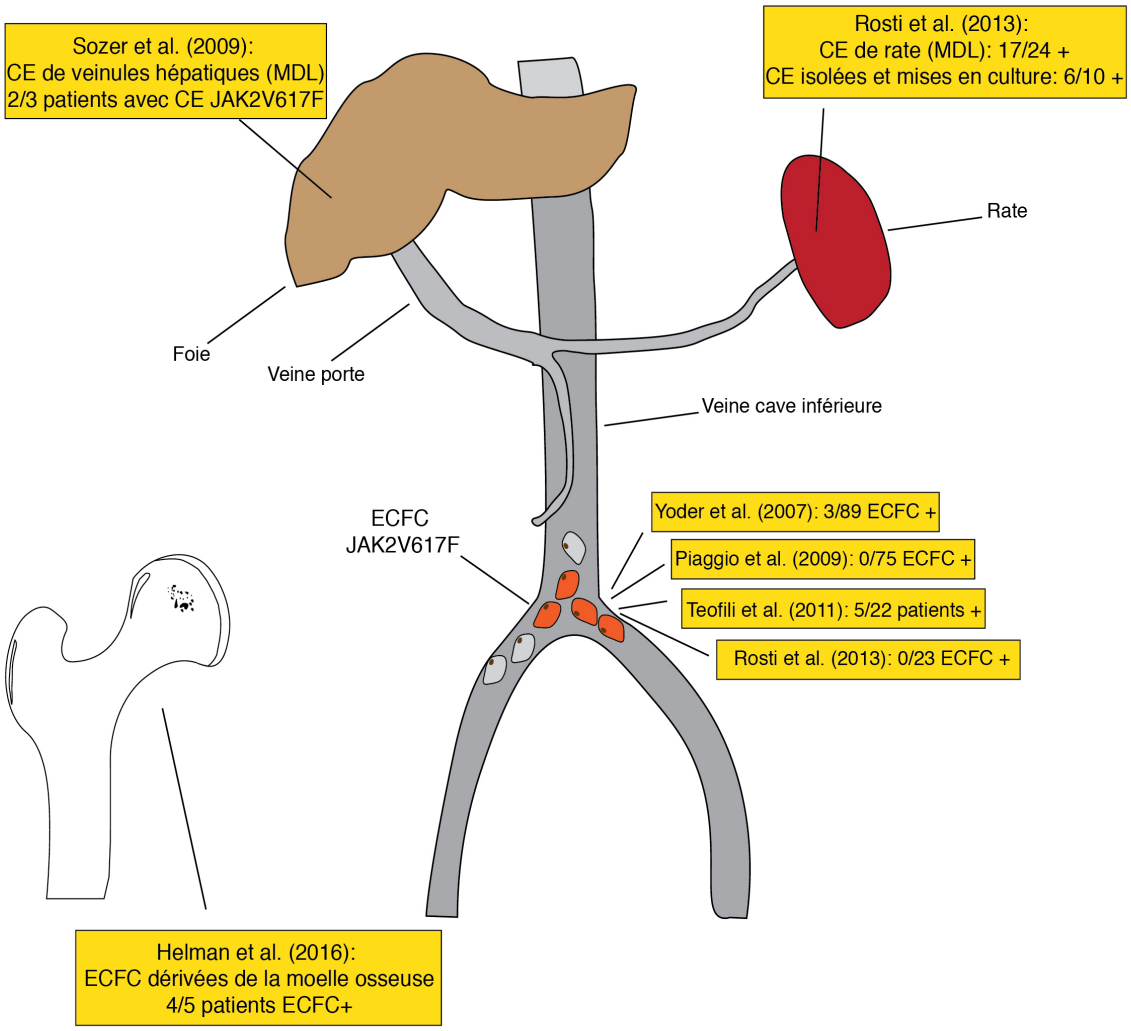


Figure 18 : Etudes ayant mis en évidence la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales (CE) de patients avec NMP JAK2V617F +

En 2007, Yoder et son équipe ont mis en évidence la mutation JAK2V617F dans 3 colonies d'ECFC (endothelial colony forming cell) issues d'un patient. La présence de la mutation JAK2V617F dans les ECFC de patients avec NMP a été confirmée en 2011 par Teofili et al. qui retrouvaient des ECFC JAK2V617F + chez 5 patients (parmis 22 patients) et en 2016 par Helman et al à partir d'ECFC dérivées de moelle osseuse.

A l'inverse, cette recherche était infructueuse pour l'équipe de Rosti en 2013, et Piaggio en 2009. La mutation JAK2V617F a été également mise en évidence dans des CE matures (technique de micro-dissection laser = MDL) chez 2/3 patients avec polyglobule de Vaquez et syndrome de Budd-Chiari (Sozer et al, 2009) et chez 17/24 échantillons de 18 patients avec myélofibrose primitive (MFP) (Rosti et al, 2013).

B. L'étude des conséquences de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales

La découverte que la mutation JAK2V617F peut être présente dans les cellules endothéliales de patients avec NMP JAK2V617F ouvre la voie à l'étude des conséquences induites par celle-ci dans le compartiment endothélial. En 2014, Etheridge et ses co-auteurs ont étudié les conséquences de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales utilisant deux modèles murins : le modèle *PF4Cre/FF1* permettant l'expression de JAK2V617F dans le compartiment mégacaryocytaire et plaquettaire, et le modèle *Tie2Cre/FF1* permettant l'expression de JAK2V617F dans les cellules endothéliales et dans l'ensemble des cellules hématopoiétiques. Dans un premier temps, les auteurs montraient que les souris *Tie2Cre/FF1* présentaient un phénotype plutôt hémorragique comparativement aux souris *PF4Cre/FF1* et aux souris wild-type (WT) : ils montraient en effet une absence de survenue d'occlusion carotidienne lors d'une agression endothéliale (test d'occlusion carotidienne au chlorure de fer) ainsi qu'une augmentation du temps de saignement de la queue. Les auteurs montraient que ces anomalies étaient secondaires à la présence d'un syndrome de Willebrand acquis dans les souris *Tie2Cre/FF1*, avec une diminution des multimères de haut poids moléculaire de facteur Willebrand et une diminution de l'agglutination à la ristocétine des plaquettes des souris *Tie2Cre/FF1*. Afin d'étudier spécifiquement le rôle des cellules endothéliales JAK2V617F, ils réalisèrent ensuite une greffe de cellules souches hématopoiétiques de souris WT dans des souris receveuses *Tie2Cre/FF1*. Dans ces souris exprimant JAK2V617F uniquement dans les CE, les auteurs rapportaient une augmentation du temps d'occlusion de l'artère carotide comparativement aux souris contrôles, mais sans retrouver de différence concernant le temps de saignement au niveau de la queue, Enfin, les auteurs montraient une diminution d'agglutination à la ristocétine des plaquettes isolées des souris exprimant JAK2V617F dans les CE (et donc potentiellement des anomalies du Willebrand), malgré une augmentation des taux de facteurs vWF et une répartition normale des multimères de facteur vWF. Cette première étude analysant les conséquences de la présence de JAK2V617F dans les CE apporte des résultats intéressants avec, selon les auteurs, des anomalies de l'hémostase plutôt pro-hémorragiques induites par la présence de JAK2V617F dans les CE. Les résultats de cette étude réalisée dans des modèles murins peuvent paraître surprenants quand on garde à l'esprit que les principales complications présentées par les patients avec NMP JAK2V61F sont essentiellement d'ordre thrombotique. Cependant, comme les auteurs le discutent dans leur article, l'hétérogénéité du compartiment endothélial peut entraîner la

survenue de complications hémorragiques dans certains tissus, et de complications thrombotiques dans d'autres **(Etheridge et al., 2014)**. Egalement, la réalisation d'une transplantation de CSH nécessité la réalisation d'une irradiation totale, pouvant perturber les propriétés du compartiment endothélial. La même équipe s'est intéressée ultérieurement aux conséquences sur l'hématopoïèse de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales **(Lin et al., 2016)(Zhan et al., 2018)**. Dans ces deux articles, les auteurs, utilisant toujours le modèle *TieCre/FF1*, montraient premièrement que les CE JAK2V617F ont des capacités d'angiogenèse et de prolifération accrues, comme nous l'avons également observé au sein de notre équipe (données non publiées) **(Kilani et al., 2014)**. De plus, les auteurs montraient que les CE JAK2V617F favorisaient la prolifération des CSH JAK2V617F, via notamment une augmentation d'expression de MPL à leur surface, de CXCL12 et de SCF. Plus récemment, la même équipe a montré que les CE JAK2V617F présentes au niveau de la niche vasculaire protégeaient les CSH JAK2V617F des irradiations à fortes doses utilisées dans le conditionnement de greffe de CSH, suggérant une participation des CE JAK2V617F dans la survenue de rechutes post-allogreffe au cours des NMP **(Lin et al., 2018)**.

Au total, il ne fait pas de doute quant à l'existence de cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F au cours des NMP, même si les mécanismes pouvant expliquer cela restent flous, voire inconnus. Cependant, les conséquences de la présence de cette mutation dans les CE n'ont été que très peu étudiées. A propos du retentissement sur l'hémostase et la coagulation, et donc sur la physiopathologie de la thrombose, seul l'article de Etheridge et de ses co-auteurs apporte des données, avec cependant quelques limites discutées ci-dessus. Notamment, leurs conclusions sont en contradiction avec les données apportées par l'article de Téofili et de ses co-auteurs ayant montré que des ECFC JAK2V617F avaient un phénotype pro-adhésif. Les conséquences de la présence de la mutation JAK2V617F au niveau des cellules endothéliales restaient donc à éclaircir, et c'est pourquoi nous avons débuté ce travail.

4ème partie : L'implication des polynucléaires neutrophiles (PNN) dans la physiopathologie de la thrombose des NMP JAK2V617F

Les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des cellules dont le rôle dans la physiopathologie de l'hémostase et de la thrombose est de plus en plus mis en avant. Dans cette quatrième partie, je présenterai les données connues sur l'implication des leucocytes dans la physiologie de l'hémostase et de la thrombose, et m'attarderai sur le phénomène d'émission de neutrophil extracellular traps (NET) et son rôle dans la physiopathologie de la thrombose.

I. Rôle des leucocytes dans l'hémostase

En conditions physiologiques, les leucocytes quiescents participent à maintenir la fluidité du sang. Notamment, les monocytes expriment à leur surface des protéines anticoagulantes : récepteur endothélial à la protéine C (endothelial protein C receptor, EPCR) **(Galligan et al., 2001)**, thrombomoduline (TM) **(McCachren et al., 1991)** ou TFPI **(McGee et al., 1994)**.

Cependant, en conditions inflammatoires, les leucocytes acquièrent un phénotype différent, synthétisant et sécrétant des facteurs procoagulants activant la coagulation :

- Les monocytes expriment fortement le facteur tissulaire (FT) en présence de molécules pro-inflammatoires comme la protéine high-mobility group-box-1 (HMGB-1) **(Ito et al., 2006),** le lipopolysaccharide (LPS) **(Toltl et al., 2008)**, ainsi que les agents de chimiothérapie **(Swystun et al., 2009)** ou l'hypoxie **(Yan et al., 1999)**. Les monocytes constituent alors la source principale de FT intravasculaire **(Butenas et al., 2005)(Shantsila and Lip, 2009)**. L'expression de FT par les autres sous-types de leucocytes est plus controversée.

- Les neutrophiles activés ex-vivo **(Maugeri et al., 2006)(Nakamura et al., 2004)** expriment de faibles quantités de FT, ce qui a été également retrouvé dans des modèles animaux **(von Brühl et al., 2012)(Darbousset et al., 2012)**.

- Il semblerait également que les polynucléaires éosinophiles puissent exprimer du FT, participant à l'augmentation du risque thrombotique au cours des hyperéosinophilies **(Moosbauer et al., 2006)(Cugno et al., 2014)**.

- En dehors de ces mécanismes, le phénomène d'émission de neutrophil extracellular traps (NETs) par les polynucléaires neutrophiles est de plus en plus étudié dans la physiopathologie de la thrombose.

II. Les polynucléaires neutrophiles (PNN) et la formation de neutrophil extracellular trap (NET)

A. Les NET

En cas d'activation, les PNN peuvent relarguer de l'ADN décondensé associé à des histones, sous forme de filets catapultés en-dehors de la cellule, nommés *neutrophil extracellular traps* ou NET. Ces NET sont associés à de nombreuses enzymes intracellulaires participant à la machinerie antibactérienne comme la myélopéroxydase (MPO), l'élastase neutrophile (*neutrophil elastase* ou NE), la pentraxine, la lactoferrine, la métalloprotéinase de matrice de type 9 (MMP9) **(Fuchs et al., 2012a)(Mitroulis et al., 2011)**. Les NET ont été découverts en 2004 par Brinkmann et ses co-auteurs. Dans cet article, les auteurs montraient que des NET pouvaient être générés *in vitro* après stimulation des PNN par différentes molécules : l'interleukine 8 (IL8), le lipolysaccharide (LPS), ou le phorbol-myristate-acétate (PMA). De plus, les auteurs montraient que les NET possèdent des propriétés de défense anti-infectieuse, du fait de l'association aux NET de MPO et d'histones, abrogées par la DNAse **(Brinkmann et al., 2004)**.

a. Mécanismes de formation

Dans un PNN, la majorité de l'ADN est sous forme condensée, associée à de la chromatine dans le noyau. L'ADN est enroulé autour d'histones afin de former des nucléosomes, puis de la chromatine. La décondensation de la chromatine est donc l'étape primordiale de la formation de NET et cette décondensation est principalement médiée par une enzyme : la peptidyl arginine deiminase 4 ou PAD4. PAD4 catalyse la conversion des arginines des histones en citrullines, entraînant une diminution de charge positive des histones et donc une diminution de la force d'interaction entre les histones et l'ADN chargé négativement. Cette diminution d'interaction entre les histones et l'ADN entraîne un « détricotage » des nucléosomes, étape pré-requise pour la formation de NET. L'activation de PAD4 est médiée principalement par l'augmentation de production intra-cellulaire de dérivés réactifs de l'oxygène ou *reactive oxygen species* (ROS) via la NADPH-oxydase. PAD4 est également activée par des influx intra-cellulaires de calcium (Ca^{++}) **(Wang and Wang, 2013)**. Il a également été montré que les neutrophiles de souris déficientes en PAD4 étaient incapables de former des NET en réponse à des activateurs bactériens **(Li et al., 2010)(Kolaczkowska et al., 2015)**. En plus du rôle primordial de PAD4,

deux autres enzymes participent à la formation de NET : l'élastase neutrophile (neutrophil elastase ou NE) et la myélopéroxydase (MPO). La NE et la MPO sont relarguées des granules azurophiles des PNN dans le cytoplasme **(Metzler et al., 2014)** puis migrent dans le noyau où elles participent à la décompaction de la chromatine **(Papayannopoulos et al., 2010)**. Il a été montré qu'une enzyme inhibitrice de NE, la secretory peptidase leukocyte inhibitor (SLPI), inhibait la formation de NET **(Zabieglo et al., 2015)** et que des souris déficientes en NE avaient une NETose déficiente **(Kolaczkowska et al., 2015)(Rossaint et al., 2014) (Figure 19)**.

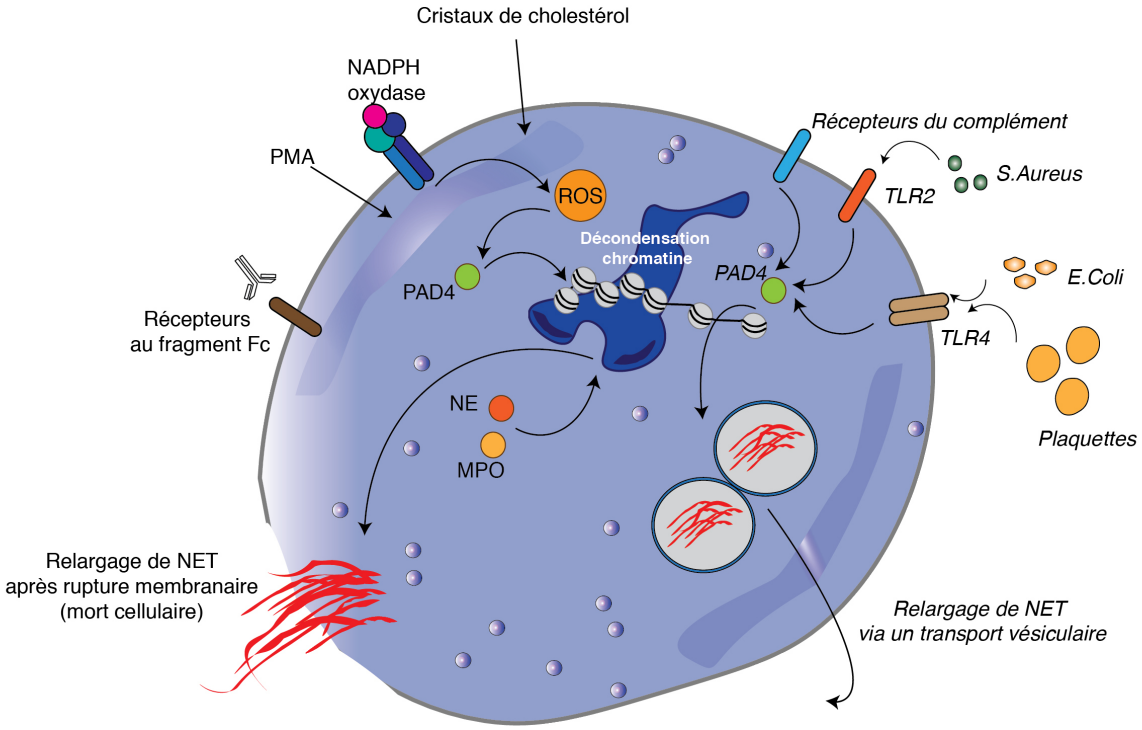


Figure 19 : Mécanismes de NETose

Deux grands mécanismes de NETose ont été identifiés : la NETose tardive, ou suicidaire, qui conduit à la mort du polynucléaire neutrophile (PNN) et la NETose précoce ou vitale, qui permet l'émission de NET sans conduire à la mort du PNN. Le mécanisme de NETose est dépendant des stimuli en jeu. Le phorbol myristate acetate (PMA), les cristaux de cholestérol, les anticorps induisent une NETose tardive avec mise en jeu d'une augmentation de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygene species, ROS) et de l'enzyme peptidyl arginine déiminase 4 (PAD4). L'activation de PAD4 est cruciale pour la décondensation de la chromatine, tout comme la migration nucléaire de l'élastase neutrophile (neutrophil elastase, NE) et la myélopéroxydase (MPO). Dans le cytoplasme, l'ADN décondensé est décoré avec les protéines intra-cellulaires puis la membrane plasmique est rompue et les NET émis. Des bactéries (S. Aureus, E. Coli), via leur liaison aux toll-like recepteurs (TLR) 2 et 4, ainsi que des plaquettes, via leur liaison au TLR4, induisent une NETose précoce. Cette NETose présente des similarités avec la NETose tardive, en dehors d'une absence de mise en jeu du métabolisme oxydatif et de l'absence de mort cellulaire, les NET étant relargués en dehors de la cellule via un transport vésiculaire.

Sur le schéma, les caractères non en italique indiquent les mécanismes de NETose tardive, les caractères en italique ceux de NETose précoce.
Figure adaptée de la figure de Jorch et Kubes dans l'article « An emerging role of neutrophil traps in nin infectious disease », Nature Medicine, 2017.

b. Inducteurs de la formation de NET

Le premier inducteur de formation de NET étudié fut le phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), une substance chimique capable d'activer de nombreuses voies de signalisation intra-cellulaires du PNN *in vitro* **(Takei et al., 1996)(Brinkmann et al., 2004)**. Le PMA induit un « burst oxydatif » dans le PNN avec activation de la cellule et assemblage des différents composants du complexe de la NADPH oxydase **(Karlsson and Dahlgren, 2002)**. La formation de NET après activation par du PMA est également dépendante de la MPO **(Metzler et al., 2011)**, enzyme qui se lie aux histones et assiste l'élastase durant la NETose induite par le PMA **(Papayannopoulos et al., 2010)**. La MPO convertit le peroxyde d'hydrogène en acide hypochlorique, acide qui diminue la charge positive des histones et diminue l'interaction entre histones et ADN **(Akong-Moore et al., 2012)**. Au cours de la NETose induite par le PMA, la membrane nucléaire est rompue, la chromatine décondensée émise dans le cytoplasme puis décorée par les différentes enzymes cytoplasmiques, et les NET émis dans l'espace extracellulaire après rupture de la membrane plasmique **(Metzler et al., 2014)**. Cette NETose nécessite une stimulation prolongée (de plusieurs heures) et entraîne une mort cellulaire, deux données qui ont fait dénommer celle-ci NETose tardive suicidaire. D'autres inducteurs sont capables d'induire une NETose tardive suicidaire : des anticorps ainsi que des cristaux de cholestérol **(Jorch and Kubes, 2017)**. De cette observation que la NETose peut survenir au cours de la mort cellulaire du PNN, ont découlé des critiques et un scepticisme sur la réalité du phénomène de NETose, qui serait l'observation *in vitro* de la mort d'un PNN, et non un phénomène physiologique. Cependant, des études ultérieures ont mis en évidence que, d'une part, la formation de NET survenait *in vivo*, mais également, qu'elle pouvait avoir lieu sans mort cellulaire concomitante. En effet, il a été montré qu'une stimulation de quelques minutes par certains inducteurs (bactéries, plaquettes, protéines du complément) pouvait induire une formation de NET appelée NETose précoce **(Clark et al., 2007)(Pilsczek et al., 2010)(Yipp et al., 2012)**. Les plaquettes peuvent être activées via le TLR4 par des endotoxines bactériennes, puis induisent la formation de NET qui lient les bactéries et provoquent à leur tour une activation endothéliale **(Clark et al., 2007)**. L'interaction entre plaquettes et PNN semble médiée en partie par la liaison entre la P-Selectine (à la surface des plaquettes) et son ligand, le P-Selectine

glycoprotein ligand 1 (PSGL1) à la surface des PNN **(Etulain et al., 2015)**. Cette promotion de la NETose par les plaquettes a également été rapportée dans l'étude de von Bruhl et al qui montrait la participation des monocytes, polynucléaires neutrophiles et plaquettes au cours de la thrombose veineuse profonde **(von Brühl et al., 2012)**. Il existe plusieurs différences entre les deux types de NETose. En effet, alors que la NETose suicidaire nécessite la production de ROS, la NETose précoce peut survenir indépendamment du métabolisme oxydatif **(Rochael et al., 2016)**. De plus, la NETose précoce n'implique pas de rupture de membrane plasmique mais un export vésiculaire. Cette absence de rupture de membrane plasmique permet à la cellule de « rester en vie » et donc de mener ses autres missions : phagocytose, destruction de bactéries. La NETose précoce semble donc associée préférentiellement à la défense anti-infectieuse **(Slaba et al., 2015)**.

c. *Mesure des NET : de quoi parle-t-on ?*

La NETose est donc le processus au cours duquel de l'ADN associé à des protéines intra-cytoplasmiques est émis en dehors du PNN. Ce phénomène est largement étudié depuis la découverte initiale faite par Brinkmann. Cependant il est important de le distinguer des processus cellulaires autres, au cours desquels de l'ADN est également émis en dehors de la cellule.

Premièrement, il est possible que la manipulation cellulaire puisse entraîner la libération de NET, par « stress physique » ou lors d'électroporation cellulaire **(Malachowa et al., 2013)**.

Deuxièmement, de l'ADN peut être libéré de cellules qui ne sont pas des polynucléaires neutrophiles. On ne parlera alors pas de NET, qui par définition sont émis par les PNN, mais de « ET » (extracellular traps). Ainsi, dans un modèle d'atteinte hépatique, il a été montré que les macrophages présents au niveau de la cavité péritonéale étaient recrutés au niveau hépatique, changeaient de phénotype, devenaient activés et permettaient le relargage d'ADN de cellules nécrotiques, ressemblant au premier abord à des NET **(Wang and Kubes, 2016)**. Les polynucléaires éosinophiles (PNE) sont des cellules également capables d'émettre des filets en d'ADN en dehors de la cellule et de générer un stress oxydatif ; la péroxydase éosinophile pouvant convertir le péroxyde d'hydrogène en dérivés oxydés de l'halogène **(Bozeman et al., 1990**). Les EET (eosinophil extracellular traps) contiennent ainsi des granules éosinophiles et sont capables de piéger des bactéries **(Ueki et al., 2013)(Ueki et al., 2016)**. Les basophiles peuvent également émettre des filets extracellulaires (BET ou basophil extracellular trap) capables de piéger des bactéries, et dont la formation est là indépendante de la NADPH oxydase **(Morshed et al., 2014)(Yousefi et al., 2015)**. Enfin, les monocytes peuvent également former des filets d'ADN extracellulaire en présence de stimulation avec du PMA **(Chow et al., 2010)**.

Troisièmement, l'ADN émis en dehors de la cellule peut également être émis à partir des mitochondries : c'est l'ADN mitochondrial qui participe à la formation de filets extracellulaires dans les PNN et les PNE **(Yousefi et al., 2008)(Yousefi et al., 2012)(Yousefi et al., 2009)**. L'ADN mitochondrial n'est pas organisé en nucléosomes et n'est pas associé à des histones **(Akhmedov and Marín-García, 2015)**. Il ne semble pas qu'il soit émis par des PNN in vivo **(Yipp et al., 2012)** mais il peut stimuler la formation de NET par les PNN, notamment lors de traumatismes et d'interventions chirurgicales, via un mécanisme indépendant de la NADPH-oxydase **(McIlroy et al., 2014)(Itagaki et al., 2015)**.

Toutes ces raisons font qu'il est donc important d'essayer au maximum de ne pas analyser ou quantifier la présence de NET via l'utilisation unique d'un marqueur d'ADN, comme le Sytox Green. Ce composé a la capacité de colorer l'ADN extracellulaire car il ne peut entrer dans les cellules vivantes mais son utilisation seule peut être biaisée par le fait que 1/ des cellules en cours de « mort cellulaire » peuvent devenir perméabilisées et permettre la pénétration du Sytox Green et 2/ des bactéries peuvent émettre de l'ADN et ainsi retenir le marquage du Sytox Green. Ainsi, il paraît recommandé d'ajouter un second marqueur d'ADN (comme un marquage d'histones) et un marqueur de protéine spécifique du PNN (comme la myélopéroxydase ou l'élastase neutrophile). Enfin, l'utilisation d'un marquage d'histone citrullinée, spécifique de la NETose, semble être un des meilleurs moyens d'analyser les NET **(Jorch and Kubes, 2017)**. *In vitro*, il est également important de travailler avec une population la plus « pure » possible en PNN, étant donné la possibilité d'autres cellules myéloïdes de former des filets extracellulaires.

En conclusion, le phénomène de NETose, découvert récemment, et initialement décrit dans les mécanismes d'immunité innée, par son action de « trapping » des agents infectieux permettant aux enzymes contenues dans le polynucléaire neutrophile d'exercer leur action, a été secondairement étudié dans la physiopathologie de la thrombose. En effet, la découverte de leur existence a amené différentes équipes à se poser les questions suivantes : quels effets ont les NET sur les cellules endothéliales lorsque les PNN sont recrutés et activés au site de thrombose ? Les NETs jouent-t-ils un rôle sur les voies de la coagulation ? Quels effets ont les NET sur les plaquettes ? Au total, quelle est l'implication des NETs dans la physiopathologie de la thrombose ?

B. Implication des NET dans la thrombose

a. Recrutement des leucocytes au site de la thrombose

Le rôle des NET dans la physiopathologie de la thrombose dépend notamment du recrutement des leucocytes au site de thrombose. Comme décrit dans la seconde partie, au cours du développement d'un thrombus, les PNN et les monocytes sont rapidement recrutés au niveau de la paroi vasculaire et/ou incorporés au sein du thrombus, de manière différente en fonction du territoire de la thrombose **(Figure 20)**.

Au cours de la thrombose artérielle, qui survient le plus souvent après une rupture de plaque d'athérosclérose et la mise en contact de la circulation sanguine avec le sous-endothélium, le recrutement des leucocytes est principalement médié par les plaquettes : celles-ci sont les premières cellules recrutées et une fois activées expriment des récepteurs d'adhésion (notamment la P-Selectine) et relarguent des chimiokines qui permettent le recrutement des leucocytes **(Furie and Furie, 2008)**. En contexte inflammatoire, les plaquettes relarguent de nombreuses molécules permettant le recrutement de leucocytes et une promotion de leurs activités bactéricides : CXC-chemokine ligand 1 (CXCL1), CXCL4, CXCL5, CXCL7, CC-ligand 3 (CCL3), CCL5, CCL7, CD154 (CD40-ligand). La liaison entre les plaquettes et les leucocytes est effectuée via différentes voies : interactions entre P-Selectine plaquettaire et PSGL1 leucocytaire, puis entre MAC-1 (ou alpha-2M-beta-2) et la GPIb et la GPIIbIIIa. A l'inverse, en l'absence d'exposition du sous-endothélium, il a été montré, à l'aide d'un modèle d'activation endothéliale par laser, que les polynucléaires neutrophiles étaient les premières cellules recrutées au site du thrombus, avant les plaquettes. Dans leur article, Darbousset et ses co-auteurs ont également montré que la génération de thrombine et de fibrine était secondaire à l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation, via le facteur tissulaire, majoritairement apporté par les PNN au site de thrombose **(Darbousset et al., 2012)**. Cette même équipe a montré que le recrutement et l'activation des PNN au cours de la thrombose artérielle était notamment médiée par l'adénosine tri-phosphate (ATP), relargué par les cellules endothéliales activées, via le récepteur à l'ATP P2X1 présent à la surface des PNN **(Darbousset et al., 2014)**.

Au cours de la thrombose veineuse, l'endothélium reste intact mais est activé, acquiert un phénotype pro-inflammatoire, ce qui permet le recrutement des leucocytes **(von Brühl et al., 2012)(Wakefield et al., 2008)** qui vont « rouler » sur l'endothélium (phénomène de rolling) puis adhérer fermement à celui-ci. L'adhésion des leucocytes au niveau de l'endothélium est dépendante des molécules d'adhésion exprimées à sa surface, et notamment de la P-Selectine

relarguée des corps de Weibel-Palade **(Ley et al., 2007)**. Les plaquettes sont recrutées de manière secondaire au cours de la thrombose veineuse, via principalement une liaison aux polynucléaires neutrophiles et aux monocytes déjà présents sur le site du thrombus **(von Brühl et al., 2012)**. Le facteur vWF relargue des cellules endothéliales via l'exocytose des corps de Weibel-Palade permet également le recrutement des plaquettes, qui à leur tour recrutent des leucocytes **(Brill et al., 2011)**.

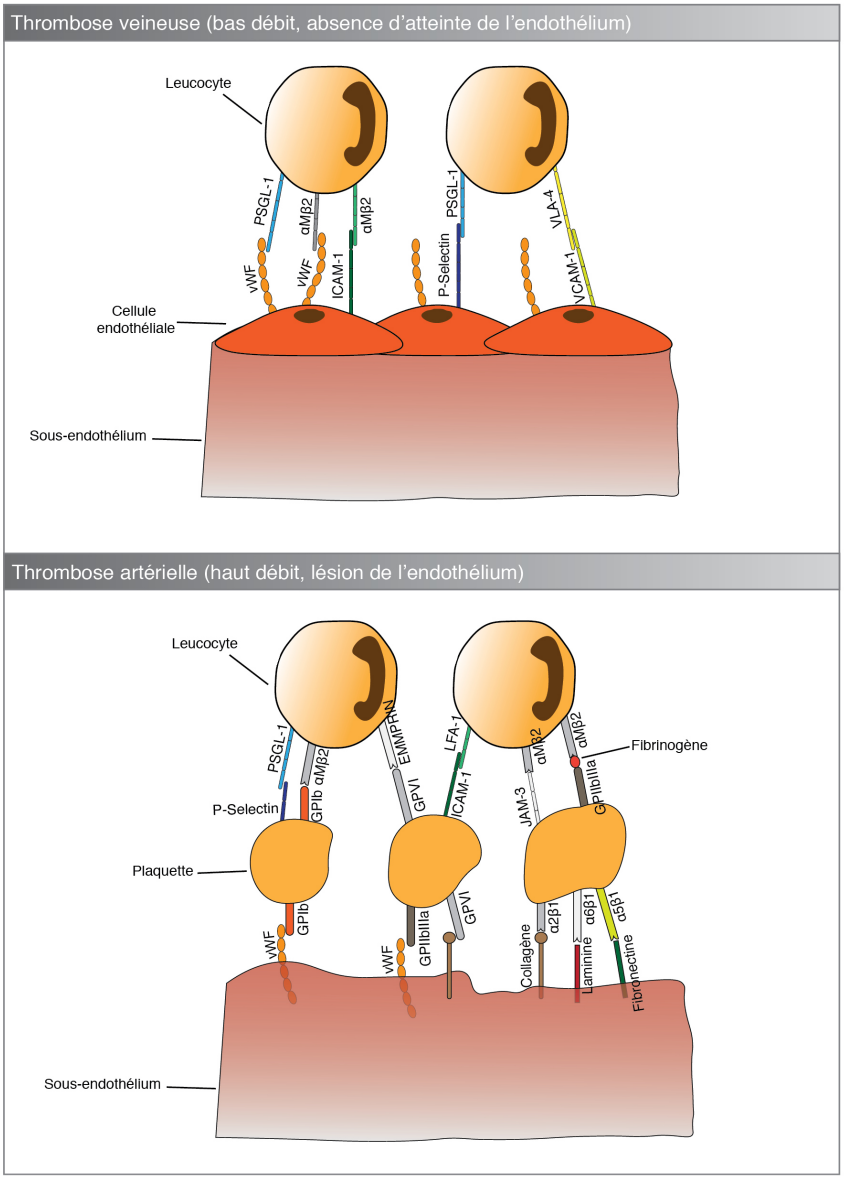


Figure 20 : Recrutement des leucocytes au site de thrombose

Le recrutement des leucocytes dépend de l'état de l'endothélium (sain ou altéré) et de la vitesse de flux. Au cours de la thrombose veineuse, les leucocytes sont recrutés au niveau de l'endothélium dans un contexte de flux lent. La liaison des leucocytes à l'endothélium se fait via le facteur Willebrand, la P-Selectine, et des molécules d'adhésion (ICAM1, VCAM1). Au cours de la thrombose artérielle, les plaquettes sont les premières cellules recrutées au niveau du sous-endothélium. Une fois activées, les plaquettes lient les leucocytes via notamment le couple P-Selectine/PSGL1.

Abréviations: vWF, von Willebrand factor ; PSGL1, p-selectin glycoprotein ligand 1 ; EMMPRIN, extracellular matrix metalloproteinase inducer ; JAM-3, junctional adhesion molecule ; LFA-1, lymphocyte function- associated antigen 1.

Figure adaptée de la figure de Swystun dans l'article « The role of leukocytes in thrombosis », Blood, 2016.

b. Mécanismes de promotion de la thrombose par les NET

Les NET potentialisent la mise en place d'un thrombus via différents mécanismes. D'une part, les NET, une fois relargués, constituent des filets sur lesquels les plaquettes se lient, sont activées, puis agrègent entre elles **(Fuchs et al., 2010)**. En plus de constituer une surface d'agrégation des plaquettes, les histones peuvent activer les plaquettes via les voies du toll-like receptor (TLR) 2 et du TLR4 **(Xu et al., 2009)(Semeraro et al., 2011)**. D'autre part, les nucléosomes externalisés lors de la NETose constituent une plate-forme pour la génération de fibrine intravasculaire. Ceux-ci permettent la colocalisation de l'élastase neutrophile et du TFPI, permettant l'inhibition du TFPI, menant à une activation de la voie extrinsèque de la coagulation **(Massberg et al., 2010)**. En dehors de l'inhibition du TFPI, les NET inhibent également la thrombomoduline, clivée par la NE et inhibée par les oxydases contenues dans le PNN **(Glaser et al., 1992)**. En réponse à des stimuli inflammatoires, les neutrophiles relarguent des metalloprotéinases de matrice et des sérines protéases comme l'élastase **(Massberg et al., 2010) (Darbousset et al., 2014)** et la cathepsine G qui vont moduler la cascade de la coagulation : activation des facteurs V **(Allen and Tracy, 1995)**, VIII **(Gale and Rozenshteyn, 2008)** et X **(Plescia and Altieri, 1996)**. Il a également été montré que les NET activaient le facteur XII en facteur XII activé, permettant une activation de la voie contact de la coagulation **(von Brühl et al., 2012)**. Les histones relarguées sont cytotoxiques pour les CE **(Xu et al., 2009)** et augmentent l'expression de FT à la surface des CE via les facteurs de transcription NFKB et AP-1 **(Yang et al., 2016)**. C'est également le cas des cytokines **(Herbert et al., 1992)**, de l'HMGB1 (high-mobility group box 1) **(Ito et al., 2006)** ou des enzymes granulaires **(Haubitz et al., 2001)**. Les histones relarguées par les leucocytes stimulent également l'exocytose des corps de Weibel-Palade, contenant du facteur von Willebrand (vWF) ainsi que de la P-Selectine **(Michels et al., 2014)(Bernardo et al., 2004) (Figure 21)**.

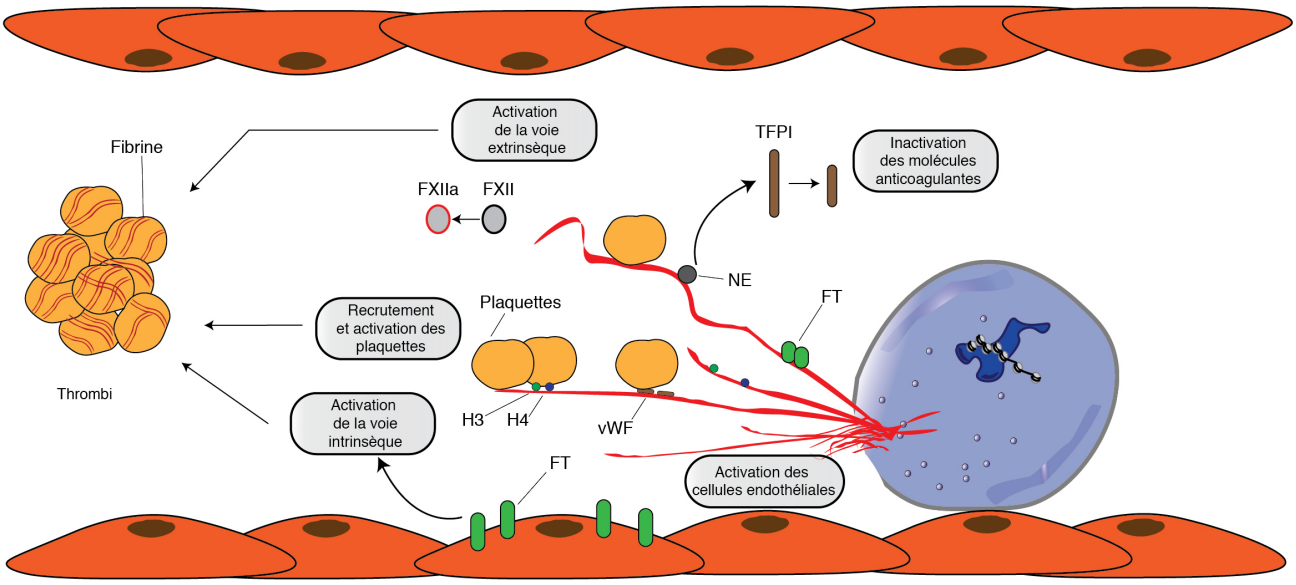


Figure 21 : Mécanismes de promotion de la thrombose par les neutrophil extracellular traps (NET)
Les NET, composés d'ADN décondensé décoré de protéines intra-cellulaires, jouent un rôle sur la thrombose via plusieurs mécanismes. Les NET activent les cellules endothéliales, entraînant une surexpression de facteur tissulaire (FT) et une activation de la voie extrinsèque de la coagulation. L'activation de la voie extrinsèque est aussi médiée par le FT associé aux NET. Les NET activent également la voie intrinsèque de la coagulation via l'activation du facteur XII, et inhibent des protéines anticoagulantes comme le TFPI (tissue factor pathway inhibitor). Enfin, les NET lient et activent les plaquettes via les histones H3 et H4 et le facteur von Willebrand lié aux NET.
Figure adaptée de la figure de Engelmann et Massberg dans l'article « Thrombosis as an intravascular effector of immunity », Nature Review Immunology, 2013.

c. *Participation des NET dans la thrombose veineuse profonde*

Des études cliniques ont montré la participation des NET dans la thrombose veineuse profonde (TVP). Des niveaux élevés de marqueurs de NET ont été retrouvés chez les patients avec TVP par rapport aux patients contrôles, notamment des taux élevés d'ADN plasmatique circulant et de nucléosomes **(Montfoort et al., 2013)**. Récemment, une équipe étudia des marqueurs de NETose chez 611 patients âgés de plus de 65 ans avec évènement thrombotique veineux. Dans cette étude, les auteurs montraient que les taux d'ADN circulant ainsi que de nucléosomes corrélaient avec l'importance de la thrombose veineuse, et que des taux d'ADN circulants élevés étaient prédictifs d'une moins bonne survie. De cette étude, les auteurs suggèrent que l'ADN plasmatique circulant pourrait constituer un biomarqueur de thrombose **(Jiménez-Alcázar et al., 2018)**.

Comme indiqué précédemment, les leucocytes sont des cellules cruciales dans la constitution d'un thrombus veineux. Des études s'intéressant à la composition de thrombi ont montré la présence de leucocytes exprimant le facteur tissulaire au sein des thrombi veineux

(Himber et al., 2002), tout comme la présence de NET **(Savchenko et al., 2014a)**. Les modèles animaux ont également apporté des arguments en faveur d'une participation des polynucléaires neutrophiles et des NET dans le phénomène de thrombose veineuse profonde. L'équipe de von Brühl a ainsi montré, dans un modèle de sténose de la veine cave inférieure (VCI) (ligature partielle de la veine cave inférieure) chez la souris, que les leucocytes étaient recrutés rapidement au site de sténose (dans un délai inférieur à 1h) et qu'à six heures suivant la sténose, la majorité de l'endothélium était recouvert de PNN. Dans cette même étude, les auteurs montraient que les PNN relarguaient des NET au site de thrombose, provoquant une activation du facteur XII **(von Brühl et al., 2012)**. Dans une étude de 2010, l'équipe de Tobias Fuchs et Denisa Wagner montrait que les NETs constituaient une surface d'accrochage et d'activation des plaquettes, des globules rouges mais également de protéines plasmatiques comme le facteur Willebrand, la fibronectine et le fibrinogène. Dans cette même étude, les auteurs montraient qu'un marqueur plasmatique de NET (ADN plasmatique) était augmenté chez des babouins avec thrombose de la veine iliaque, de manière associée à des marqueurs de NET au niveau du thrombus (complexe ADN-Histone2A-Histone2B) **(Fuchs et al., 2010)**. En 2012, la même équipe a étudié la participation des NET dans la thrombose veineuse profonde en utilisant le modèle de sténose de la VCI chez la souris. Dans cet article, ils montraient que les taux d'ADN plasmatique étaient augmentés dans les 6 heures suivant la sténose, et que les thrombi formés contenaient des NET (présence d'histone H3 citrullinée). De plus, l'administration d'histones chez la souris favorisait la formation de thrombose induite par la ligature de VCI, alors qu'un traitement par DNAse de type I était protecteur **(Brill et al., 2012)**.

Comme dit précédemment, les enzymes PAD4 et neutrophile élastase sont cruciales pour la génération de NET. Utilisant un modèle déficient en PAD4 (souris PAD4 -/-), il a été montré que l'absence de PAD4 au niveau hématopoiétique entraînait un déficit de formation de NET conduisant à une diminution de survenue de thrombose veineuse dans un modèle de sténose de la VCI **(Martinod et al., 2013)**. Cependant, utilisant toujours le modèle de sténose de la VCI, la même équipe a montré que l'absence d'élastase neutrophile au niveau des PNN (souris NE-/-) conduisait à une diminution modérée de la formation de NET, et n'induisait pas de différences en terme de survenue de thromboses **(Martinod et al., 2016)**. Ces résultats suggèrent un rôle secondaire de l'élastase neutrophile dans la génération de NET, et dans la thrombose veineuse induite par cette génération de NET.

d. Participation des NET dans la thrombose artérielle

Alors que la thrombose veineuse survient en présence d'un endothélium intact mais activé, l'exposition au niveau sanguin du matériel procoagulant situé au niveau du sous-endothélium est le plus souvent l'évènement précipitant de la thrombose artérielle. La thrombose artérielle survient dans des conditions de haut débit sanguin, accompagné de forces de cisaillement importantes, entraînant une liaison des plaquettes aux protéines du sous-endothélium, notamment le facteur Willebrand et le collagène, et permettant la génération d'un thrombus riche en plaquettes. Les plaquettes activées relarguent des cytokines qui modulent l'activation leucocytaire **(Clark et al., 2007)(Mallat et al., 1999)** avant que des agrégats leuco-plaquettaires soient formés, premier évènement de la thrombose artérielle **(Swystun and Liaw, 2016)**.

Sur le plan clinique, une étude a étudié des marqueurs de NET chez des patients avec coronaropathie. Dans cette étude prospective ayant inclus 282 patients, les auteurs ont montré que des taux plasmatiques élevés d'ADN double-brin, de nucléosomes, et de complexes MPO-ADN étaient associés à une atteinte coronaire sévère évaluée par scanner coronaire. De plus, il était montré que des taux élevés d'ADN double-brin et de nucléosomes à la date d'inclusion dans l'étude étaient associés à une survenue plus fréquente d'évènements cardio-vasculaires majeurs au cours du suivi **(Borissoff et al., 2013)**. Des études ont également apporté des arguments pour la présence de NET *in situ*, au niveau des sites d'athérosclérose, à partir d'échantillons d'endartériectomie **(Megens et al., 2012)**, et chez des patients avec infarctus myocardique. Dans cette dernière étude, les auteurs ont montré que des NET étaient présents au niveau des artères coronaires responsables de l'infarctus, et également que ces NET étaient colocalisés avec du facteur tissulaire. Ils montraient également que le facteur tissulaire exprimé au niveau du site de thrombose était capable d'induire une génération de thrombine, permettant une activation des plaquettes, qui à leur tour activaient les neutrophiles ; ceux-ci générant des NET **(Stakos et al., 2015)**. Une des principales études à propos de l'implication des NET dans la thrombose artérielle dans un modèle murin a été réalisée par l'équipe de Steffen Massberg. Dans cette étude utilisant deux modèles de thrombose, un modèle d'atteinte chimique de l'artère carotide par chlorure de fer et un modèle de ligation de l'artère carotide, les auteurs ont montré que les souris double-déficientes en élastase neutrophile et cathepsine G avaient une formation de thrombi diminuée, du fait d'une diminution de la dégradation du TFPI par l'élastase neutrophile. Les auteurs montraient également que les nucléosomes externalisés au niveau sanguin constituent une surface d'assemblage de l'élastase neutrophile, de la cathepsine G et du TFPI, permettant une dégradation du TFPI par les NET. Enfin, les auteurs montraient que l'administration d'un anticorps dirigé contre le complexe ADN-H2A-H2B (complexe entre l'ADN et les histones

faisant partie des NET) entraîne une diminution de production de fibrine au sein du thrombi artériel ainsi qu'une diminution d'adhésion des plaquettes au site de thrombose dans des souris WT, confirmant le rôle des NET dans la thrombose artérielle, sans retrouver cet effet dans les souris double-déficientes en élastase neutrophile et cathepsine G **(Massberg et al., 2010)**. Les conséquences de l'inhibition de la NETose dans la thrombose artérielle peuvent être étudiées via l'administration de DNAse. Contrairement à ce qui a été retrouvé dans la thrombose veineuse **(Brill et al., 2012)**, il a été montré chez des souris saines que l'administration de DNAse n'entraînait pas d'augmentation du temps d'occlusion artériel dans un modèle d'atteinte chimique par chlorure de fer **(Kannemeier et al., 2007)**. Cependant, l'effet bénéfique de l'inhibition de la NETose dans la thrombose artérielle a été montré dans deux modèles murins pathologiques. Dans un premier modèle de souris développant de l'athérosclérose, les souris *ApoE-/-*, il a été montré que l'inhibition de la peptidyl-arginine-deiminase (PAD) par l'administration de Cl-amidine entraînait une diminution des lésions d'athérosclérose, de la formation de NET ainsi que du recrutement de PNN dans la média du sinus aortique **(Knight et al., 2013)**. L'effet de l'inhibition de PAD a été retrouvé dans un modèle de souris lupique, le modèle New Zealand Mixed 328 (NZM), chez qui l'inhibition de PAD conduisait également à une diminution de la formation de NET et une augmentation du temps d'occlusion artériel **(Knight et al., 2014)**. Enfin, il a été montré que la formation de NET, à partir de polynucléaires neutrophiles activés par des cristaux de cholestérol, participait à la formation d'athérosclérose via le « priming » des macrophages, conduisant au relarguage par les macrophages d'IL-1-beta et l'activation de cellules TH17 (Warnatsch et al., 2015).

e. Participation des NET au cours de la thrombose associée aux cancers

La production de NET semble augmentée au cours du cancer. Ainsi, en 2012, l'équipe de Denisa Wagner et Melanie Demers a étudié le phénomène de NETose chez des souris porteuses de cancer du sein et de leucémie myéloïde chronique (LCM) et montré que les PNN isolés de ces souris avaient une formation de NET accrue. Cette formation de NET augmentée était notamment due à la production de G-CSF par la tumeur, cytokine entraînant un « priming » des PNN. De plus, les auteurs montraient que les souris porteuses de tumeurs du sein avaient une formation de thrombi augmentée au niveau pulmonaire, et cela dès sept jours après l'injection de cellules tumorales, avec la présence de NET au niveau des thrombi. Ils montraient également que cet état pro-thrombotique était en partie secondaire au G-CSF avec l'apparition de thrombi au

niveau pulmonaire chez des souris contrôles injectées avec du LPS et du G-CSF **(Demers et al., 2012)**. Plaidant également pour la participation des NET dans le mécanisme de thrombose associée aux cancers, une autre étude a montré que les anomalies de perfusion au niveau rénal et cardiaque chez des souris porteuses de tumeurs étaient dépendantes de la formation de NET au niveau sanguin périphérique, avec notamment un effet bénéfique de l'administration de DNAse **(Cedervall et al., 2015)**. Il serait intéressant de mettre en évidence des marqueurs de NET associés à la survenue de thrombose au cours du cancer. Un premier possible serait le taux d'ADN plasmatique circulant. Des taux d'ADN plasmatique élevés ont été retrouvés au cours de nombreux types de cancers **(Fleischhacker and Schmidt, 2007)**, même s'il est très probable qu'une large part de cet ADN plasmatique soit issu des cellules tumorales ou des cellules non-tumorales lésées par la tumeur **(Jahr et al., 2001)**. La formation de NET augmentée au cours du cancer semble participer à cette élévation d'ADN plasmatique constatée. Ainsi, il a été montré que les patients avec micro-angiopathie thrombotique (MAT) associée à un cancer avaient des taux d'ADN plasmatique augmentés, de manière corrélée avec des marqueurs de NET comme la MPO ou la calprotectine **(Fuchs et al., 2012b)**. L'histone H3 (H3) citrullinée, un marqueur plus spécifique de la NETose, avait également été retrouvée augmentée dans cette même étude chez les patients avec MAT en phase aiguë par rapport aux patients contrôles, suggérant l'utilisation de ce marqueur comme témoin d'un évènement thrombotique au cours du cancer **(Fuchs et al., 2012b)(Demers and Wagner, 2014)**. Dans une étude parue en 2016, un groupe de patients avec accident vasculaire ischémique a été analysé. Les auteurs montraient que les patients avec un taux élevé de troponine ultra-sensible avaient une prévalence accrue de cancers et qu'un taux élevé de troponine ultra-sensible était associé à une augmentation des taux de marqueurs de NET, suggérant une association entre marqueurs de NET et thrombose associée aux cancers. De plus, les auteurs montraient que les patients avec AVC ischémique et cancer avaient des marqueurs de NET augmentés au niveau plasmatique (ADN plasmatique, MPO et H3 citrullinée) par rapport aux patients avec AVC ischémique sans cancer et qu'il existe une corrélation entre les marqueurs de NET et un état pro-coagulable évalué par le taux de complexe thrombine-anti-thrombine (TAT). De faible effectif et rétrospective, cette étude suggèrait que des marqueurs de NET peuvent être quantifiés pour dépister une thrombose artérielle associée au cancer **(Thålin et al., 2016)**. De manière intéresssante, une étude récente a montré que des taux élevés d'H3 citrullinée étaient associés à une incidence de survenue de thrombose veineuse augmentée chez des patients avec cancers suivis de manière prospective (Mauracher et al., 2018).

Au total, le rôle du phénomène de NETose dans la physiopathologie de la thrombose artérielle, veineuse, associée aux cancers, a été mis en évidence dans de nombreuses études, ouvrant la voie à de possibles implications thérapeutiques. A noter qu'en dehors des phénomènes de thrombose artérielle et veineuse, le phénomène de NETose a également été étudié dans de nombreuses autres situations pathologiques : thrombose des petits vaisseaux, maladies auto-immunes, vascularites, diabète, …

D. Les NET comme cibles thérapeutiques au cours de la thrombose

Devant les données s'accumulant ces dernières années sur le rôle des NET au cours de la thrombose, la question se pose de savoir si des molécules inhibitrices de la NETose pourraient jouer un rôle anti-thrombotique en pathologie humaine **(Figure 22)**. Cependant, même si l'idée d'une inhibition de le NETose dans la prévention ou le traitement des maladies thrombotiques ou dans le traitement des maladies auto-immunes est séduisante, une telle inhibition aura certainement des conséquences sur l'immunité innée, notamment en augmentant le risque infectieux dû à une « mise au repos » des polynucléaires neutrophiles. A ma connaissance, pour le moment, aucunes données n'existent sur les conséquences d'une inhibition ciblée de la NETose sur la survenue de la thrombose veineuse ou artérielle chez l'homme.

Un des moyens d'inhiber les conséquences de la NETose est l'administration de DNAse, tout en gardant à l'esprit que la DNAse n'inhibe pas la formation de NET mais « démantèle » les NET déjà formés. Comme dit plus haut, il a été montré que l'administration de DNAse chez la souris menait à une diminution de la survenue de thrombose veineuse dans un modèle de sténose de la veine cave inférieure spontanée **(Brill et al., 2012)(von Brühl et al., 2012)**, induite par l'injection d'anticorps anti-phospholipides **(Meng et al., 2017)**, ainsi qu'à une diminution des troubles de perfusion associés au cancer **(Cedervall et al., 2015)**. Au cours de la thrombose artérielle, l'administration de DNAse n'entraînait pas de modification de temps d'occlusion artériel dans un modèle d'atteinte de l'artère carotide par chlorure de fer **(Kannemeier et al., 2007)**, mais améliorait les lésions secondaire à un AVC ischémique **(De Meyer et al., 2012a)** ou un infarctus du myocarde **(Savchenko et al., 2014b)** chez la souris. Chez l'homme, l'administration de DNAse est déjà utilisée en pratique clinique, par voie inhalée, au cours de maladies respiratoires et notamment de la mucoviscidose **(VanDevanter et al., 2017)**. Une étude clinique a étudié l'effet d'administration de DNAse recombinante chez des 17 patients avec néphrite lupique, sans effets secondaires, mais sans modification significative de marqueurs d'activité de la maladie **(Davis et al., 1999)**. Cependant, même si l'ADN émis par les NET est

démantelé par la DNAse, les autres composants des NET (comme l'élastase neutrophile ou les histones) ne le sont pas et continuent à jouer un rôle pro-inflammatoire au niveau de la paroi vasculaire **(Kolaczkowska et al., 2015)**.

Un autre moyen d'inhiber la formation de NET est d'inhiber ou de bloquer l'enzyme PAD4 qui n'a pas de conséquences sur le métabolisme oxydatif du PNN, car située en aval de la production de ROS. L'avantage supplémentaire du blocage de PAD4 est le fait que son inhibition ne mène pas une diminution des capacités de phagocytose du PNN **(Li et al., 2010)**. Ainsi, il a été montré que l'absence de PAD4 ne modifiait pas la dissémination bactérienne **(Martinod et al., 2015)** ou la sévérité d'une infection par un virus influenzae **(Hemmers et al., 2011)**. Cependant, il a été montré que certains pathogènes étaient sensibles à la NETose mais pas à la phagocytose **(Branzk et al., 2014)** (*Candidas albicans hyphae*, *Mycobacterium bovis*) et que la NETose aidait à diminuer la propagation bactérienne de souches comme *Staphylococcus Aureus* ou *Escherichia Coli* **(Belaaouaj et al., 1998)(Pilsczek et al., 2010)**. De plus, l'étude de Li et al. a montré que les souris déficientes en PAD4 étaient plus sensibles que des souris contrôles à une infection par une souche de streptocoque A dans un modèle de fasciite nécrosante **(Li et al., 2010)**. A propos de l'étude de la thrombose, il a été montré que l'absence de PAD4 (souris PAD4-/-) menait à une diminution de survenue de thrombose veineuse dans un modèle de sténose de la veine cave inférieure **(Martinod et al., 2013)**, ainsi qu'une diminution de la taille de l'infarctus dans un modèle d'ischémie/reperfusion du myocarde **(Savchenko et al., 2014b)**. En dehors de la thrombose, il a été montré que l'inhibition de PAD (via un inhibiteur chimique) menait à une diminution de la sévérité de la maladie dans un modèle murin de lupus systémique **(Knight et al., 2015)(Knight et al., 2013)**, d'arthrite inflammatoire **(Willis et al., 2011)** et de diabète **(Wong et al., 2015)**. Cependant, l'inhibition dans ces dernières études n'était pas spécifique de PAD4, mais de toutes les isoformes de PAD. A noter que, récemment, une équipe a développé un inhibiteur spécifique de PAD4 inhibant la formation de NET par des PNN de souris et des PNN humains **(Lewis et al., 2015)**.

Le blocage de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (*reactive oxygene species* ou ROS) pourrait également être une voie d'inhibition de la NETose *in vivo*. L'étude des conséquences d'un blocage de la production de ROS a été étudié dans le domaine des maladies auto-immunes, via l'étude de modèles murins de maladie lupique et d'arthrite inflammatoire déficients pour la NADPH oxydase **(Campbell et al., 2012a)(Maicas et al., 2011)**, et via l'administration de molécule inhibant la formation de ROS (N-acétyl-cystéine) chez des patients atteints de lupus systémique **(Garcia et al., 2013)(Lai et al., 2012)**. Cependant, il est possible que le blocage de la production de ROS par les PNN expose à la survenue de complications auto-

immunes ou de manifestations granulomateuses comme cela est constaté chez les patients atteints de granulomatose septique chronique **(Gennery, 2017)**, et comme cela a été montré dans l'étude des modèles murins déficients en NADPH-oxydase.

Autre molécule déjà largement connue dans le domaine des traitements anticoagulants, l'héparine permet également de dissocier les NET **(Fuchs et al., 2010)** et de diminuer les interactions entre les NET et les plaquettes **(Fuchs et al., 2011)**. L'héparine permet également de dissocier les histones de l'ADN, permettant un meilleur accès de la DNAse à l'ADN **(Napirei et al., 2009)**. Ainsi, une combinaison entre un traitement par DNAse et un traitement par héparine pourrait avoir un effet synergique dans le traitement de la thrombose.

Une autre façon d'inhiber l'effet des NET serait d'inhiber l'effet néfaste des histones associées aux NET. En effet, comme dit plus haut, il a été montré que l'administration d'histones dans des modèles murins entraînait la survenue de thrombose veineuse **(Brill et al., 2012)** et majorait les lésions d'AVC ischémiques dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne (De Meyer et al., 2012b). Dans cette même étude, l'utilisation d'anticorps anti-histone entraînait une diminution des lésions ischémiques. Une voie intéressante serait l'utilisation de la protéine C activée (PCA), qui a la capacité de cliver les histones *in vitro* et *in vivo* et de prévenir la mortalité associée à l'injection d'histones dans un modèle murin **(Xu et al., 2009)**.

D'autres molécules, à action non-spécifique contre les NET, peuvent jouer un rôle sur l'adhésion des PNN au niveau de l'endothélium ainsi que sur la NETose. Ainsi, il a été montré que l'aspirine inhibait de façon directe la formation de NET in vitro, en conditions d'hyperthermie ou d'acidose **(Lapponi et al., 2013)**. De plus, l'aspirine en inhibant les fonctions plaquettaires, pourrait participer à une inhibition indirecte de la NETose via l'interaction entre les plaquettes et les PNN. Le facteur vWF joue un rôle majeur dans l'adhésion des plaquettes à l'endothélium, via la liaison de son domaine A1 à la glycoprotéine 1b. Le facteur vWF joue également un rôle dans le rolling et l'adhésion des PNN et des monocytes aux cellules endothéliales, via sa liaison à la PSGL-1 et aux intégrines de type béta-2 **(Pendu et al., 2006)**. Une inhibition du facteur Willebrand pourrait ainsi constituer une cible indirecte d'inhibition de la NETose via une inhibition de la liaison des PNN et des plaquettes à l'endothélium. L'ADAMTS13, protéase clivant les multimères du facteur vWF **(Furlan and Robles, 1996)**, réduit la thrombose lorsque administrée *in vivo* **(Chauhan et al., 2006)**, entraîne une réduction de la taille des lésions ischémiques dans des modèles d'ischémie/reperfusion myocardique (De Meyer et al., 2012b) ou d'AVC ischémique **(Zhao et al., 2009)**. L'administration d'ADAMTS13 recombinante entraîne également une diminution du recrutement de PNN au niveau des lésions

ischémiques myocardiques (De Meyer et al., 2012b) Enfin, l'étude de Savchenko et al. montrait que l'administration concomitante d'ADAMTS13 recombinante et de DNAse avait un effet synergique sur la taille de l'infarctus dans le modèle d'ischémie/reperfusion du myocarde **(Savchenko et al., 2014b)**. Ces études démontrent l'effet bénéfique sur la survenue de thrombose de cibler d'une part le recrutement leucocytaire (via notamment l'inhibition du facteur vWF par l'ADAMTS13), et d'autre part la formation de NET (via notamment l'administration de DNAse). Autre protéine d'intérêt dans le recrutement leucocytaire à l'endothélium et l'interaction entre plaquettes et neutrophiles, la P-Selectine pourrait constituer une autre cible d'intérêt dans la prise en charge de la thrombose. En effet, il a été montré que l'inhibition de la P-Selectine conduisait à une diminution de la survenue de thrombose dans des modèles murins **(von Brühl et al., 2012)(Myers et al., 2005)**, une diminution du recrutement des PNN au niveau de l'endothélium (von Brühl et al., 2012), une diminution de son activité pro-coagulante **(Myers et al., 2005)(Andre et al., 2000)**, ainsi qu'une diminution de la formation de NET **(von Brühl et al., 2012)**.

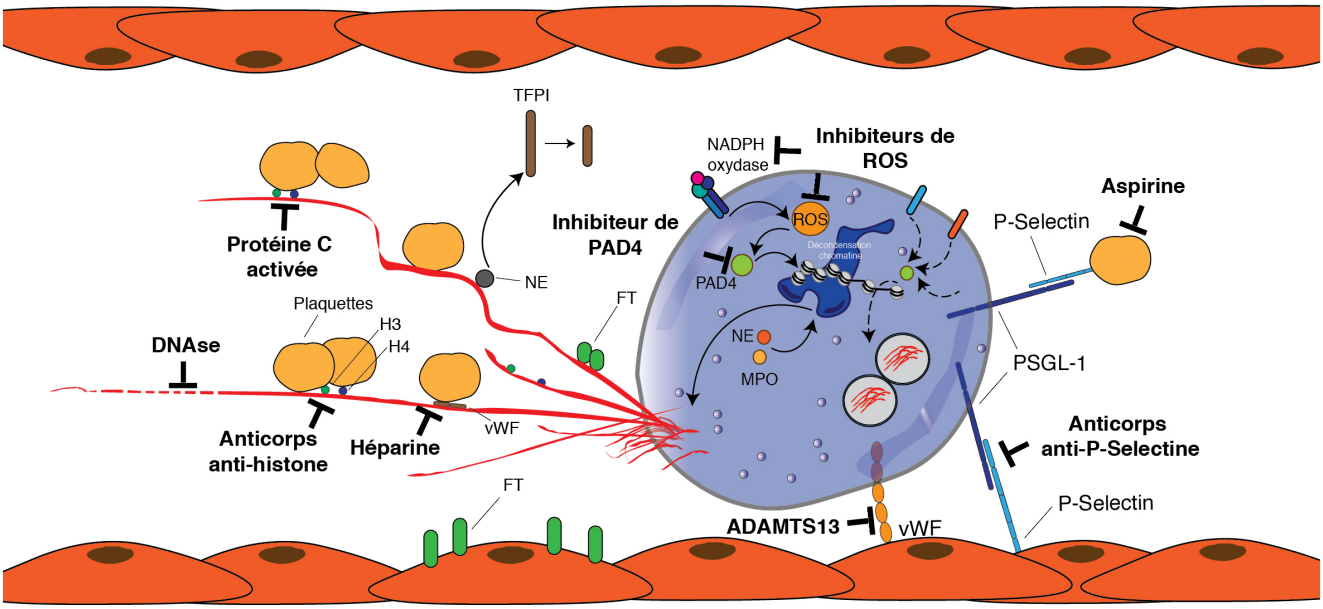


Figure 22 : Voies d'inhibition de la NETose

L'inhibition de la NETose est possible via des molécules à action spécifique. L'administration de DNAse entraîne le démantèlement de l'ADN contenu dans les NET. L'inhibition de la peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) pourrait permettre un blocage de la production de NET, tout comme le blocage de la production de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygen species ou ROS). Cibler les histones, via un anticorps anti-histone ou la protéine C activée, pourrait aussi consituter une cible.

Des molécules à action plus étendue pourraient également jouer un rôle dans la NETose. L'héparine permet de dissocier les plaquettes des NET formés. Etant donnée la possibilité d'activation des PNN par les plaquettes, l'aspirine pourrait permettre d'inhiber les fonctions plaquettaires, et inhiber la formation de NET de manière indirecte. Enfin, la liaison des PNN aux cellules endothéliales pourrait être inhibée par la protéase ADAMTS13 (qui clive les multimères du facteur Willebrand) ou un anticorps anti-P-Selectine.

En conclusion, la découverte récente du rôle joué par les NET dans la thrombose ouvre la voie à de nouvelles possibilités thérapeutiques dans la prise en charge de la thrombose, via des traitements spécifiques ou non-spécifiques de la NETose. De manière plus large, le rôle du polynucléaire neutrophile comme cellule clef dans la physiopathologie de la thrombose est de plus en plus étudié, tout comme son rôle pivot entre d'un côté l'immunité innée, de l'autre l'hémostase et la thrombose.

Hypothèses et objectifs du travail de thèse

Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des maladies hématologiques acquises de la cellule souche hématopoiétique responsables d'une prolifération accrue des cellules sanguines. Parmi les NMP, on distingue les NMP caractérisées par une mutation V617F de la protéine JAK2 qui comportent la thrombocytémie essentielle, la polyglobulie de Vaquez et la myélofibrose primitive.

En dehors de la progression fibrotique et de la transformation leucémique, le risque principal de ces maladies est la survenue d'une thrombose, au niveau artériel ou bien veineux, responsable d'une morbi-mortalité importante. Bien que des progrès, d'une part dans la compréhension de la physiopathologie de ces thromboses, d'autre part dans la prise en charge thérapeutique veillant à prévenir la survenue de ces thromboses, aient été réalisés ces dernières années, beaucoup reste à faire. En effet, malgré l'avancée des connaissances, on constate que les patients avec NMP continuent à présenter des thromboses. De plus, comme dit plus haut, les patients avec NMP présentent des thromboses dans des sites « inhabituels » ou rares, comme le territoire splanchnique ou les veines cérébrales. Cet état de faits laisse donc suspecter une physiopathologie particulière et spécifique de la thrombose au cours des NMP. Et, en effet, comme cela a été décrit en amont, les données de la recherche fondamentale disponibles nous démontrent que des processus pathologiques particuliers et spécifiques sont à l'œuvre au cours des NMP : rôle de la mutation JAK2V617F dans l'activation cellulaire, rôle du taux de cellules sanguines, atteinte simultanée de plusieurs compartiments cellulaires.

C'est dans l'optique d'une meilleure compréhension de cette physiopathologie particulière que s'inscrit mon travail de thèse. Celui-ci comporte deux grands axes. Premièrement, l'étude du rôle des cellules endothéliales (CE) avec mutation JAK2V617F et, deuxièmement, l'étude du rôle des polynucléaires neutrophiles (PNN) et du phénomène de formation de neutrophil extracellular traps ou NET.

1ère hypothèse : Les cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F participent à la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP JAK2V617F

L'hypothèse d'une participation de cellules endothéliales portant la mutation JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP a été soulevée devant plusieurs constatations.

Premièrement, des données montrent que le compartiment endothélial est activé au cours des NMP, avec notamment des marqueurs d'activation endothéliale retrouvés augmentés chez les patients.

Deuxièmement, des articles récents ont montré que la mutation JAK2V617F pouvait être présente au sein du compartiment endothélial, au niveau de cellules endothéliales matures, et au niveau de progéniteurs endothéliaux circulants (ECFC). De manière intéressante, Téofili et ses co-auteurs, qui ont montré que certains patients étaient porteurs d'ECFC avec mutation JAK2V617F, démontraient également dans leur article que les ECFC avec mutation JAK2V617F avaient un phénotype pro-adhésif, suggérant donc une participation de ces cellules dans la physiopathologie de la thrombose **(Teofili et al., 2011)**. D'un autre côté, les articles de Sozer et Rosti montraient que des CE matures (isolées par microdissection laser au niveau hépatique et splénique) pouvaient également être porteuses de la mutation JAK2V617F **(Sozer et al., 2009a)(Rosti et al., 2013)**. Ces articles sont intéressants car les cellules endothéliales isolées le sont dans des territoires bien particuliers : les capillaires hépatiques et spléniques, ainsi que les veinules hépatiques. Cela suggère donc que le compartiment endothélial mature pourrait être porteur de la mutation JAK2V617F au niveau de ces territoires, avec un rôle dans la physiopathologie des thromboses particulières (territoire splanchnique) présentées par les patients avec NMP.

Au total, même si ces articles démontraient que la présence de la mutation JAK2V617F pouvait être présente au niveau des cellules endothéliales des patients avec NMP, nous n'avions que très peu de données sur les conséquences de la présence de cette mutation au niveau des cellules endothéliales. A noter toutefois le travail d'Etheridge et de ses co-auteurs qui montrait, dans des modèles murins, que les CE avec mutation JAK2V617F étaient responsables de perturbations de l'hémostase, avec quelques limites et nuances : utilisation d'une version humaine de la protéine JAK2, modèle de souris greffée avec irradiation pouvant perturber le

compartiment endothélial, mise en évidence d'une augmentation du taux de facteur Willebrand chez les souris avec CE JAK2V617F.

L'hypothèse de ce premier axe de travail était donc d'étudier l'implication des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP avec mutation JAK2V617F.

Pour cela, nous avons utilisé deux approches complémentaires. Premièrement, nous avons effectué des expériences *in vivo* à l'aide d'un modèle murin permettant l'expression de la mutation JAK2V617F uniquement dans les cellules endothéliales (le modèle *PDGFb-iCre ; JAK2*$^{V617F/WT}$), en croisant des souris JAK2 knock-in (KI) avec des souris dotées du système Cre-Lox (système permettant la survenue d'une recombinaison et donc la présence d'une protéine d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur tissu-spécifique). La grande difficulté a été de caractériser les différents modèles murins décrits dans la littérature comme endothélial-spécifique, en vérifiant l'efficacité et la spécificité de recombinaison des différents modèles. Avec également la problématique spécifique qui était que la présence de la mutation JAK2V617F dans un compartiment cellulaire entraine une prolifération importante de ce compartiment, révélant une spécificité moins bonne que décrite dans la littérature avec d'autres protéines d'intérêt. Tout ce travail a été mené par Badr Kilani, étudiant en thèse m'ayant précédé, et qui a permis que mon travail de thèse ait lieu. En parallèle, nous avons effectué des analyses *in vitro* en utilisant des cellules endothéliales humaines transduites avec un lentivirus apportant les versions wild-type ou V617F de JAK2.

2ème hypothèse : Les polynuclaires neutrophiles et le phénomène de NETose participent à la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP JAK2V617F

De manière parallèle à ce premier axe de travail, nous en avons initié un second portant sur le rôle des polynucléaires neutrophiles (PNN) et du phénomène de NETose dans la physiopathologie de la thrombose des NMP. En effet, les données disponibles dans la littérature, et détaillées ci-dessus, apportaient des arguments en faveur d'un rôle des PNN dans cette physiopathologie. Premièrement, les données disponibles étaient en faveur d'une activation des PNN au cours des NMP. Deuxièmement, la description initiale du phénomène de NETose (expulsion de filets d'ADN et de protéines intra-cellulaires en dehors du PNN) comme « moyen » de défense anti-infectieuse a été largement étendue et approfondie dans le domaine de la thrombose avec, ces dernières années, de nombreuses données montrant que les NET jouaient également un rôle dans la physiopathologie de la thrombose.

Enfin, même si les mécanismes intra-cellulaires en jeu dans l'initiation de la NETose ne sont pas complètement élucidés, un article intéressant de Demers et co-auteurs a montré que la voie du G-CSF jouait un rôle dans le déclenchement de la NETose. La mutation JAK2V617F participant à l'activation de la voie du G-CSF (entre autres), cette donnée constituait un argument supplémentaire pour une NETose accrue dans les PNN avec mutation JAK2V617F.

L'hypothèse de ce second axe de travail était donc que le phénomène de NETose était augmenté au cours des NMP, et que cette augmentation de NETose participait de la physiopathologie de la thrombose.

Ce travail a comporté deux grandes parties. La première partie a porté sur une cohorte de patients avec NMP chez lesquels nous avons mis au point puis quantifié le phénomène de NETose de manière directe et indirecte. Afin d'analyser d'une part les mécanismes en jeu et, d'autre part, l'implication de la NETose dans la physiopathologie de la thrombose, nous avons également, dans une seconde partie, caractérisé puis étudié le phénomène de NETose dans deux modèles murins différents : un modèle permettant d'obtenir la présence de la mutation JAK2V617F dans l'ensemble du compartiment hématopoiétique (le modèle *PF4iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$) et un modèle permettant d'obtenir la présence de la mutation JAK2V617F uniquement dans le compartiment granuleux (le modèle *MRP8iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$).

Résultats

Nous présenterons les résultats obtenus au cours de la thèse sous forme d'articles :

Article 1 : L'expression endothéliale de la mutation JAK2V617F induit un état pro-thrombotique secondaire à une augmentation d'expression de P-Sélectine.

Article 2 : Les biomarqueurs de NET comme des facteurs de risque de thrombose associée aux néoplasies myéloprolifératives.

Article 3 : Les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles collaborent pour induire une formation de neutrophil extracellular trap (NET) augmentée au cours des néoplasies myéloprolifératives avec mutation JAK2V617F.

<u>Article 1</u> : L'expression endothéliale de la mutation JAK2V617F induit un état pro-thrombotique secondaire à une augmentation d'expression de P-Sélectine.

Accepté dans *Haematologica*

La présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales (CE) a été mise en évidence par plusieurs équipes indépendantes. L'objectif de ce travail était d'analyser les conséquences de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales et l'implication des cellules endothéliales JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose au cours des néoplasies myéloprolifératives (NMP) avec mutation JAK2V617F.

Pour cela, nous avons utilisé deux approches complémentaires : l'utilisation de cellules endothéliales veineuses (human umbilical venous endothelial cells, HUVECs) transduites avec un lentivirus apportant la mutation JAK2V617F et l'utilisation d'un modèle murin, le modèle *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2*$^{V617F/WT}$ permettant la présence de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial.

Nous avons premièrement démontré que la formation de thrombi était augmentée chez les souris *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2*$^{V617F/WT}$. Afin d'explorer ce phénotype pro-thrombotique, nous avons analysé l'adhésion des leucocytes *in vivo* et *in vitro* et constaté une augmentation d'adhésion des leucocytes en présence de CE JAK2V617F. Cette augmentation d'adhésion est médiée par une augmentation d'expression de P-Sélectine et de facteur von Willebrand (vWF) à la surface des CE JAK2V617F, constatée *in vitro* et *in vivo* dans le modèle *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2*$^{V617F/WT}$. De manière intéressante, nous avons montré que l'inhibition de la P-Séléctine menait à une diminution de l'adhésion et du rolling des leucocytes in vivo, mais également à une diminution de la formation de thrombi dans le modèle *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2*$^{V617F/WT}$. Enfin, nous avons constaté que l'hydroxyurée (HU), traitement fréquemment utilisé en pratique clinique, prévenait la survenue de thrombose dans le modèle *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2*$^{V617F/WT}$ et jouait un role direct au niveau des cellules endothéliales, notamment via une inhibition de la voie JAK/STAT dans les CE.

Au total, ce travail a permis de démontrer que les CE JAK2V617F avaient un rôle pro-thrombotique au cours des NMP JAK2V617F, avec une activation des CE médiée par la mutation JAK2V617F et une augmentation d'expression de la P-Sélectine à leur surface.

Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression

Running title: JAK2V617F endothelial cells are pro-thrombotic

Alexandre Guy[1] ; Virginie Gourdou-Latyszenok[1] ; Nicolas Le Lay[2] ; Claire Peghaire[1] ; Badr Kilani[1] ; Juliana Vieira Dias[1]; Cécile Duplaa[1] ; Marie-Ange Renault[1] ; Cécile Denis[3] ; Jean Luc Villeval[4] ; Yacine Boulaftali[2] ; Martine Jandrot-Perrus[2] ; Thierry Couffinhal[1,5] ; Chloe James[1,6]

[1] Univ. Bordeaux, Inserm, UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France

[2] Univ. Paris Diderot, Inserm, UMR_S1148, LVTS, Paris, France

[3] Inserm U1176, Hemostasis Inflammation Thrombosis, Le Kremlin-Bicêtre, France

[4] Univ. Paris XI, Inserm U1170, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France

[5] CHU de Bordeaux, Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, F-33600 Pessac, France

[6] CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie, F-33600 Pessac, France

Address correspondence to: Chloe James, INSERM UMR 1034, CHU Haut-Lévêque, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac. Phone: +33-5-57-89-19-79; E-mail: chloe.james@inserm.fr.

Keywords: Thrombosis/ Myeloproliferative neoplasms/ Endothelial cells/ P selectin

Abstract

Thrombosis is the main cause of morbidity and mortality in patients with JAK2V617F myeloproliferative neoplasms. Recent studies have reported the presence of JAK2V617F in endothelial cells of some patients with myeloproliferative neoplasms. We investigated the role of endothelial cells that express JAK2V617F in thrombus formation using an *in vitro* model of human endothelial cells overexpressing JAK2V617F and an *in vivo* model of mice with endothelial-specific JAK2V617F expression. Interestingly, these mice displayed a higher propensity for thrombus. When deciphering the mechanisms by which JAK2V617F endothelial cells promote thrombosis, we observed that they have a pro-adhesive phenotype associated with increased endothelial P-selectin exposure, secondary to degranulation of Weibel-Palade bodies. We demonstrate that P-selectin blockade was sufficient to reduce the increased propensity of thrombosis. Moreover, treatment with hydroxyurea also reduced thrombosis and decreased the pathological interaction between leukocytes and JAK2V617F endothelial cells through direct reduction of endothelial P-selectin expression. Taken together, we provide evidence that JAK2V617F endothelial cells promote thrombosis through induction of endothelial P-selectin expression, which can be reversed by hydroxyurea. Our findings increase our understanding of thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms, at least those with JAK2V617F endothelial cells, and highlight a new role for hydroxyurea. This novel finding provides the proof of concept that an acquired genetic mutation can impact the pro-thrombotic nature of endothelial cells, suggesting that other mutations in endothelial cells could be causal in thrombotic disorders of unknown cause which account for 50% of recurrent venous thrombosis.

Significance Statement

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are hematological malignancies characterized by an increase in red cells, platelets or leukocytes. Most of the patients with MPN carry a mutation in the *Janus kinase 2* (*JAK2*) gene, ie. *JAK2*V617F in their blood cells, but some of the patients also carry this mutation in their endothelial cells (EC), ie the cells that line blood vessels. Thromboses are the main causes of morbidity in these patients, but their cause is still poorly understood. In this paper, we use a mouse model with specific expression of JAK2V617F in EC to assess their role in the occurrence of thrombosis. We demonstrate that JAK2V617F EC are sufficient to promote thrombosis and identify therapeutic strategies to target these prothrombotic EC.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are acquired clonal hematopoietic stem cell disorders, characterized by an increase in one or more myeloid lineages. The Philadelphia chromosome-negative (Ph-) MPNs include polycythemia vera (PV) with an excess of red blood cells, essential thrombocythemia (ET) with an increase of platelets, and primary myelofibrosis (PMF).[1] More than 90% of patients with PV and half of those with ET and PMF carry a mutation in the *Janus kinase 2* (*JAK2*) gene, ie. *JAK2*V617F.[2-5] JAK2 is a tyrosine kinase that initiates intracellular signaling of various type 1 cytokine receptors, such as erythropoietin and thrombopoietin receptors.[6] The JAK2V617F mutation is responsible for constitutive activation of JAK2 kinase, resulting in subsequent activation of its downstream signaling pathways, ultimately leading to overproduction of myeloid cells.

Arterial and venous thromboses are the main causes of morbidity in Ph- MPNs with reported incidences ranging from 12-39% in PV and 11-25% in ET.[7] The pathogenesis of thrombosis in MPN patients is complex and still largely elusive.[8] A variety of blood cells have been reported to participate in this pathophysiology: (i) platelets isolated from MPN patients show signs of enhanced *in vivo* activation;[9] (ii) leukocytes are activated and hyperleukocytosis is an independent risk factor for thrombosis;[9-11] and (iii) red blood cells from PV patients display increased adhesion to the endothelium.[12] However, evidence also exists that JAK2V617F can be present not only in blood cells but also in endothelial cells (EC) from JAK2V617F positive MPN patients.[13-15]

Under physiological conditions, the endothelium maintains a hemostatic balance between both pro and anti-thrombotic factors. When stimulated by extrinsic factors such as inflammatory cytokines, hypoxia or antiphospholipid antibodies, ECs become activated and promote thrombosis.[16] Whether ECs can become pro-thrombotic due to intrinsic modifications such as genetic mutations, has not yet been demonstrated.

In the current study, we tested whether vascular ECs expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state. Specifically, we investigated the hemostatic properties of JAK2V617F ECs and their role in thrombus formation using human ECs overexpressing human JAK2V617F, and mice with EC-specific JAK2V617F expression.

Methods

In vitro static adhesion of normal blood cells on endothelial cells

Blood from healthy volunteers was collected in EDTA tubes after informed consent was obtained. Mononuclear cells and neutrophils were isolated after Pancoll density gradient or neutrophils separation medium (Polymorphprep, Fresenius Kabi) and marked with CellTracker Orange. 10^5 cells were plated over confluent HUVECs for 1 hour at 37°C. After removal of non adherent cells, adherent cells were visualized using a fluorescent microscope (AxioObserver, Zeiss), and images analyzed by ZEN imaging software (Zeiss). Experiments were performed using 3 to 6 wells per condition with 12 images taken in each well. The quantification method was previously described.[15,17] When noted, we added 10 µg/ml P-Selectin blocking antibody (AK4 clone, BioLegend) 30 minutes before plating blood cells on HUVECs.

In vitro neutrophils adhesion on HUVECs under flow conditions

Channels (Vena8 Endothelial + Cellix) were coated with human fibronectin (100ng/ml) before infusing 3.10^6 /ml HUVECs.[18] After 2 hours at 37°C, cells were exposed for 48 hours to a 2 period-flow (Kima Pump, Cellix): perfusion (3 minutes, 600 µL/min) and resting (20 minutes no flow). After 48 hours, a confluent monolayer had developed. 3.10^6/ml neutrophils were infused with a 10µL/min venous flux and imaged using a Zeiss microscope, 20X in phase contrast, for 5 minutes. Channels were washed with medium and images of every channel were recorded. Neutrophils quantification was performed blindly and neutrophils velocity was studied with FIJI (Image J).

In vivo leukocytes adhesion to mesenteric venules

Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$ mice and *Pdgfb-iCreERT2negative;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice were used 15-20 days post tamoxifen injection. Mice were injected with intra-peritoneal (IP) 250 ng TNF-

alpha and 4 hours later, anesthetized with ketamine/xylazine. Leukocytes were stained with 3.6 mg/kg Rhodamin 6G (Sigma-Aldrich). For each mouse, five mesenteric venules of 150- to 250-µm diameter were observed for 90 seconds within 30 minutes after the surgical procedure, using a fluorescent microscope (AXIO Zoom.V16, Zeiss). When noted, 25 µg of P-selectin blocking antibody (RB40 clone, BD Biosciences) or isotype control (A110-1 clone, BD Biosciences) was injected 5 minutes before starting the analysis.

Mouse model of thrombosis

To induce platelet activation, IP injection of 75µg/kg collagen (Nycomed Pharma) and 30µg/kg epinephrine (Helena Laboratories) was performed 3 minutes before euthanasia.[19,20] To increase inflammation, 250ng TNF-alpha (RD Systems) was injected 4 hours before euthanasia. After euthanasia, PBS was perfused for 3 minutes after intracardiac puncture, and 10% formalin for 3 more minutes. When noted, 25µg P-selectin blocking antibody was injected 4 hours prior to euthanasia.

Statistics

Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was calculated using the Student t test or Mann-Whitney statistical test to compare differences between 2 groups. For multiple groups, we used 1-way-ANOVA followed by Tukey post-hoc test or 2-way-ANOVA followed by Sidak post-hoc test. GraphPad Prism 6 was used. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Animals

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines provided by the Institutional Animal Care and Use Committee at Inserm (Agreement number C45-234-6).

Results

Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$ mice are a reliable model to investigate JAK2V617F endothelial cell properties

To analyze the specific role of JAK2V617F ECs in thrombus formation, we crossed *Pdgfb-iCreERT2* mice with the conditional flexed *JAK2 (JAK2$^{V617F/WT}$)* mice[21], to allow heterozygous expression of JAK2V617F in ECs after tamoxifen administration. Since oral tamoxifen administration has been shown to result in recombination activity in megakaryocytes within 2 days[22], all experiments were performed and analyzed 15-20 days after tamoxifen injection, to allow time for recombined megakaryocytes to mature and be cleared. We first analyzed the efficiency of recombination using *Pdgfb-iCreERT2*;*mT/mG* mice, and observed that all vessels in the mesentery and retina were GFP positive. (Fig. S1 *A-C)*. To confirm EC JAK2V617F expression in *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2$^{V617F/WT}$* mice, we sorted CD31 positive cells from the kidney and observed a 50% ratio of *JAK2V617F*/ total *JAK2* in accordance with a heterozygous expression of JAK2V617F in all endothelial cells (data not shown). In sorted CD31 positive lung ECs, Western-Blot analysis demonstrated an increased phosphorylation level of the downstream effector AKT in line with an increased activation of the JAK pathway (Fig. S1 *D* and *E*). Because myeloproliferative syndromes have been described in EC-specific mouse models[23,24], we ensured our experimental conditions did not lead to abnormal hematopoiesis. We did not observe any difference in blood cell counts in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice, suggesting that the hematopoietic system was not significantly altered **(**Table S1**)**. To definitively exclude an hematopoietic expression of JAK2V617F in *Pdgfb-iCreERT2*;*JAK2$^{V617F/WT}$* mice, we crossed *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice with *mT/mG mice* to generate *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$*;*mT/mG* mice permitting co-expression of *JAK2V617F* and green fluorescent protein (GFP) in cells after Cre-mediated excision (Fig. S1*F*). Flow cytometry analysis did not reveal any GFP expression in granulocytes, platelets and red blood cells in

Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$*;mT/mG* mice 20 days after tamoxifen administration **(**Fig. S1*F***)**, confirming that Cre recombination under the Pdgfb promoter is highly restricted to ECs 15-20 days after tamoxifen administration.

The expression of JAK2V617F by ECs leads to increased thrombus formation

To investigate whether *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice displayed a higher propensity for thrombosis, we examined pulmonary thrombus formation using experimental conditions that allowed assessment of EC involvement, without exposure of the sub-endothelium: (i) spontaneous thrombosis under basal conditions, (ii) a mild thrombosis model with administration of low doses of collagen along with epinephrine to specifically induce a weak activation of platelets and vasoconstriction and better demonstrate an intrinsic pro-thrombotic phenotype of JAK2V617F ECs, and (iii) a weak inflammatory trigger of thrombosis with injection of low dose TNF-alpha (250 ng/mouse). The dose of 500 ng/ml TNF-alpha is commonly used to trigger inflammation[25-27] and we chose the lower dose to reveal a potential hypersensitivity to inflammation. To quantify thrombi, we performed Carstairs staining which allows viewing of platelets, red blood cells, and fibrin[28]. Small spontaneously formed thrombi were observed in the lungs of *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, but not in littermate *JAK2*$^{V617F/WT}$ control mice (Fig. 1*A***)**. In the 2 models of mild induction of thrombosis, we observed a significant increase in thrombus formation in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice compared with controls (Fig. 1 *A*-*C*). Together, these results demonstrate that JAK2V617F ECs have a pro-thrombotic phenotype.

JAK2V617F ECs have normal anticoagulant activity

Next, we sought to decipher the mechanisms by which EC JAK2V617F expression leads to a pro-thrombotic phenotype. To assess whether the expression of JAK2V617F by ECs decreased their anticoagulant properties or even triggered pro-coagulant properties, we sought to measure

thrombin generation at the surface of HUVECs transduced with lentivirus encoding for either human JAK2V617F or JAK2 wild-type (JAK2WT), or with an empty lentivirus as control. Our data shows that HUVECs were efficiently transduced as (i) 95% of JAK2V617F or JAK2WT HUVECs were eGFP positive as assessed by flow cytometry (Fig. S2*A*) and (ii) the mRNA JAK2V617F mutational burden was 99.5% in JAK2V617F HUVECs (Fig. S2*B*). Western blot analysis revealed induced protein expression of JAK2 in JAK2V617F and JAK2WT transduced cells. Introduction of JAK2V617F led to an increase in the phosphorylation level of JAK2, STAT3 and AKT, in agreement with a hyperactivation of the JAK/STAT pathway (Fig. S2*C*). Under resting conditions, measurement of thrombin generation at the surface of control, JAK2WT- or JAK2V617F-lentivirus infected HUVECs did not reveal any significant difference in the kinetics or extent of thrombin generation. These results indicate that there is no significant gain of pro-coagulant activity in response to JAK2WT or JAK2V617F-induced HUVEC expression (Fig. 2 *A* and *B*). We next hypothesized that JAK2V617F HUVECs might acquire a procoagulant phenotype due to the exposure to circulating inflammatory stimuli. We thus repeated the experiments after overnight activation with 10ng/ml TNF-alpha, but did not observe any difference (Fig. 2 *A* and *B*). We also measured the rate of thrombin-triggered protein C activation and did not observe any difference between the cells (Fig. 2*C*). Finally, we quantified production of nitrite and prostaglandin (6-keto-Prostaglandin 1-alpha) and did not find any difference between JAK2WT and JAK2V617F HUVECs with or without stimulation by TNF-alpha (Fig. 2 *D* and *E*). To assess whether JAK2V617F ECs increase the hemostatic potential in vivo, we used whole blood thromboelastometry in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. No difference was observed in clotting time, clot formation time, ten minute-amplitude or alpha angle after stimulation of the extrinsic pathway (Fig. S3).

JAK2V617F ECs have a pro-adhesive phenotype in vitro and in vivo

Exposing ECs to inflammatory stimuli leads to expression of adhesion molecules that allow rolling and adhesion of leukocytes, a phenomenon that is thought to participate in the pathogenesis of thrombosis. Using JAK2V617F transduced HUVECs, we observed an increase in static adhesion of normal MNCs **(**Fig. 3*A***)**, and normal polymorphonuclear neutrophils (PMN) isolated from healthy subjects **(**Fig. 3*B*), as previously reported with patients-derived JAK2V617F EC. Under flow conditions, we also observed more normal PMNs rolled and stably adhered to JAK2V617F HUVECs as compared to JAK2WT HUVECs (Fig. 3 *C-E*). To assess whether this pro-adhesive phenotype was also present in vivo, we injected *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice with rhodamin to track leukocytes. Using intravital microscopy, we observed mesenteric venules and quantified leukocyte adhesion and rolling. We observed that both leukocyte rolling and adhesion were significantly increased in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice previously exposed to low dose TNF-alpha (Fig. 3 *F, G* and *H*).

P-selectin expression is increased in JAK2V617F ECs

The adhesion of leukocytes to ECs is mediated by Cell Adhesion Molecules (CAM) and selectins.[29] Flow cytometry analysis demonstrated that JAK2V617F HUVECs expressed inter-CAM-1 (ICAM-1), vascular-CAM-1 (VCAM-1) and E-selectin at the same level as JAK2WT HUVECs, whether or not they were previously activated with TNF-alpha (Fig. 4*A* and Fig. S4). Immunostaining of non-permeabilized carotid arteries from *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice showed an increased exposure of P-selectin at the ECs surface *in vivo*, whether or not they were previously administered with TNF-alpha (Fig. 4 *B* and *C*). Conversely we observed increased levels of soluble P-selectin in the plasma of *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice (Fig. S5*A*). As most soluble P-selectin is of platelet origin, we ruled out an increase of soluble P-selectin due to increased platelet count (Fig. 4*D*). Finally, we excluded increased platelet activation in *Pdgfb-*

iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$ mice by quantifying soluble Platelet Factor 4 (Fig. S5*B*). Taken together, these results support the notion of increased membrane-attached and plasmatic soluble P-selectin from endothelial origin without an increase in EC expression of ICAM-1, VCAM-1 or E-selectin.

Endothelial expression and release of Von Willebrand factor is increased in JAK2V617F ECs in vitro and in vivo

Within ECs, P-selectin is stored in exocytotic organelles called Weibel-Palade bodies together with von Willebrand factor (vWF). Exocytosis of Weibel-Palade bodies leads to cell surface expression of vWF and P-selectin. Since we had observed an increase in endothelial P-selectin expression, we next investigated whether vWF was also increased. *In vitro*, using immunostaining on non-permeabilized HUVECs, we observed increased vWF expression at the surface of JAK2V617F HUVECs, spontaneously and after overnight activation with 10ng/ml TNF-alpha (Fig. 5*A*). Furthermore, vWF quantification in the conditioned media revealed higher amounts of vWF released by JAK2V617F HUVECs (Fig. 5*B*), a difference that was even increased when cells have been treated with TNF-alpha. These results were confirmed *in vivo* with higher levels of vWF antigen in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice compared with control mice (Fig. 5*C*). There was no difference in the distribution of vWF multimers between *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and control. This data demonstrates that endothelial JAK2V617F increased vWF at the protein level and soluble vWF release, in association with increased P-Selectin expression at the cell surface, as a consequence of increased degranulation of Weibel-Palade bodies.

Increased P-selectin exposure is involved in the pro-adhesive and pro-thrombotic phenotype of JAK2V617F ECs

To investigate a potential causal link between increased P-Selectin expression at the EC surface and the pro-adhesive phenotype of JAK2V617F ECs, we reproduced the same experiments as

previously described, but in the presence of a P-selectin blocking antibody. Our *in vitro* approach with JAK2V617F HUVECs showed a complete reversion of the hyper-adhesive properties of JAK2V617F HUVECs when they had been exposed for 30 minutes with the P-selectin blocking antibody (Fig. 6 *A* and *B*). Quantification of leukocytes in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice treated with TNF-alpha and the P-selectin blocking antibody revealed a complete inhibition of leukocyte rolling in control mice, which was expected given the well-established role of P-selectin in leukocyte rolling (Fig. 6*C*). In mutant mice, administration of P-selectin blocking antibody completely reversed pathologically increased leukocytes adhesion (Fig. 6 *C* and *D*). To examine whether increased P-selectin was also responsible for thrombus formation, we used the model of low dose TNF-alpha induced lung thrombus formation (as shown in Fig. 1). We observed that pre-treatment of the mice with the P-selectin blocking antibody completely abrogated thrombus formation in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, but had no effect in control mice (Fig. 6*E*). These results demonstrate that the pro-thrombotic phenotype of JAK2V617F ECs is primarily the consequence of increased adhesive properties, due to overexpression of membrane P-selectin.

Treatment with hydroxyurea abrogates TNF-alpha induced thrombosis in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice through decreased P-selectin expression

Hydroxyurea is an anti-metabolite frequently used in MPN to reduce the occurrence of thrombosis. Its anti-thrombotic effect is reported to be via the reduction of blood cell counts. Hydroxyurea is also used in sickle cell disease to reduce vaso-occlusive crisis, and its beneficial effect is in part mediated by a direct effect on ECs, with a reduction in leukocyte adhesion.[30] We hypothesized that hydroxyurea might be capable of reducing the pro-thrombotic effect of JAK2V617F ECs. To test this, we treated *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ and control mice with hydroxyurea for 10 days, injected low dose TNF-alpha and quantified thrombus formation in the

lungs after 4 hours. We observed a significant inhibition of thrombus formation in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice (Fig. 7*A*). We then investigated whether hydroxyurea had modified ECs adhesiveness. We observed a reduction in leukocyte rolling and adhesion in mesenteric venules 4 hours after TNF-alpha administration in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice treated with hydroxyurea (Fig. 7 *B* and *C*). To further determine whether this was due to a direct effect on ECs, we treated JAK2V617F HUVEC with 100 μM hydroxyurea for 24h, washed them and analyzed neutrophils adhesion in vitro. Interestingly, there was a significant reduction of neutrophil adhesion on JAK2V617F HUVEC pretreated with hydroxyurea (Fig. 7*D*). Having previously demonstrated that the pro-adhesive phenotype of JAK2V617F ECs was mediated by P-selectin, we examined whether the protective effect of hydroxyurea acted through reduction of endothelial P-selectin. As we had previously shown that soluble P-selectin was a reflection of endothelial P-selectin in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, we measured levels of soluble P-selectin after treatment with hydroxyurea. We observed that the P-selectin/platelets ratio was significantly lower in hydroxyurea-treated *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice than in non-treated mice **(**Fig. 7*E***)**. In these same mice, we used immunostaining to quantify P-selectin expression at the surface of carotid ECs. We observed a significant decrease of endothelial membrane P selectin expression, confirming a direct effect of hydroxyurea on JAK2V617F ECs (Fig. 7*F*). This effect is in part secondary to JAK/STAT pathway inhibition, as hydroxyurea administration reduces the level of STAT3 phosphorylation in JAK2V617F HUVECs (Fig. S6). Finally, we observed decreased vWF concentrations in the supernatant of JAK2V617F HUVECs treated with hydroxyurea, indicating a reduced release of Weibel Palade bodies (Fig. 7*G*). Altogether, our *in vitro* and *in vivo results* demonstrate that hydroxyurea has a direct effect on JAK2V617F ECs, decreasing endothelial P-selectin release and surface expression, thus decreasing an ECs pro-thrombotic phenotype.

Discussion

Despite significant advances in deciphering the molecular mechanisms responsible for MPN occurrence and transformation, the mechanisms that lead to thrombosis, the main cause of morbidity and mortality, remain largely elusive. Recent identification of the JAK2V617F mutation in ECs of patients with MPN[13-15] opens new perspective in the pathogenesis of thrombosis in MPNs. Here we demonstrate that JAK2V617F positive ECs promote spontaneous thrombosis under basal conditions and have increased thrombotic response to weak inflammatory stimuli. We describe that the mechanism that leads to thrombosis involves endothelial P selectin release and cell surface exposure and subsequent leukocyte rolling and adhesion. We also describe that treatment with hydroxyurea decreases P-selectin endothelial expression and thrombus formation in mice expressing JAK2V617F only in ECs.

We used a mouse model that allows expression of JAK2V617F in ECs only, to ensure that the phenotype observed in these mice was solely due to the presence of JAK2V617F ECs. We are aware that there are differences between our model and patients with MPN, who often have JAK2V617F blood cells together with some JAK2V617F ECs. Moreover, not all patients have JAK2V617F ECs, and for those that do, it is currently not known where they are located. Our mouse model is thus not representative of the human situation and is not meant to be a model of MPN, however it does allow precise characterization of the properties of JAK2V617F ECs.

The link between P-selectin expression and thrombosis has previously been described, and in most cases P-selectin is from platelet origin.[28,31,32] The mechanism of P-selectin mediated thrombosis involves neutrophil activation, either through tissue factor expression and activation of the extrinsic coagulation pathway[28], or through priming for neutrophil extracellular trap formation[33], a process that is now well recognized to participate in thrombus formation.[34] Increase in endothelial P-selectin and subsequent thrombosis was reported in response to venous flow reduction and local hypoxia.[28] Here, we show for the first time that ECs can have

constitutive increased expression of P-selectin, even without any hypoxic or inflammatory stimuli. Further studies are now required to decipher the specific intracellular mechanism responsible for increased P-selectin expression in JAK2V617F expressing ECs. One possible mechanism could be increased STAT3 phosphorylation, as STAT3 activation has been shown to upregulate expression of P-selectin in ECs[35] (Fig. S7).

Given that MPN are acquired hematological malignancies, the description of pro-thrombotic JAK2V617F ECs raises the question of their origin. JAK2V617F ECs have been found in microdissected vessels[13,14] and after culture of circulating endothelial progenitors, both in Colony Forming Unit-Endothelial Cell (CFU-EC)[15,36-38] and Endothelial Colony Forming Cells (ECFC).[15,38] The presence of JAK2V617F CFU-EC in all MPN patients was not surprising given that CFU-EC are of hematopoietic origin. But ECFC are not of hematopoietic origin and the presence of JAK2V617F EC thus suggests the existence of a progenitor cell of hematopoietic and endothelial lineages. Such cells certainly exist in the embryo but its existence in adults is a matter of debate. In the case of microdissection experiments,[13,14] it is possible that the JAK2V617F ECs that have been micro-dissected derive from CFU-EC.[39] Altogether, in MPN, the presence of JAK2V617F ECs of real endothelial origin is probably rare but the presence of JAK2V617F ECs of hematopoietic origin is common. Demonstrating that JAK2V617F ECs have a pro-thrombotic phenotype is thus particularly relevant in our understanding of the pathogenesis of thrombosis in MPN.

Our study has important therapeutic implications. We demonstrate that treatment with hydroxyurea inhibits the pathological hyper-adhesive phenotype of JAK2V617F ECs. The results presented here challenge current thinking, according to which the anti-thrombotic effect of hydroxyurea in MPN is only mediated by lowering the blood cell count. However, a direct effect of hydroxyurea on ECs has been reported[40,41], via stimulation of the NO-cGMP pathway in ECs, and reduction of leukocyte rolling.[30] Moreover, in patients with sickle cell disease,

treatment with hydroxyurea efficiently decreases the frequency of vaso-occlusive crisis.[42] This result suggests that hydroxyurea should be considered for patients with MPN and a history of thrombosis. This is often the case as hydroxyurea is the first line therapy in these high-risk patients. But in young patients, hydroxyurea is usually avoided due to its potential leukemic effect, even if large retrospective studies are not in favor of this leukemic effect.[43-45] The antithrombotic and leukemic effects of hydroxyurea should thus be addressed in a prospective cohort of young MPN patients with thrombosis.

Another therapeutic implication of our work comes from the demonstration that increased endothelial P-selectin favors thrombosis in MPN, as was shown in sickle cell disease.[46] Very recently, a clinical trial demonstrated that treatment with an anti-P-selectin antibody, crizanlizumab, efficiently prevented pain crises in sickle cell disease.[47] It is thus tempting to speculate that such treatment could have therapeutic benefits in MPN patients with high thrombotic risk, who need to receive anticoagulant treatment for a MPN-related thrombosis (such as splanchnic thrombosis).

Our description of the pro-thrombotic profile of JAK2V617F ECs can appear to contradict with the results of Etheridge et al.[48] These authors used *Tie2-Cre/FF1* mice, which allow constitutive expression of human JAK2V617F in blood and ECs, irradiated then transplanted them with the bone marrow of wild type mice to generate mice in which only the ECs express JAK2V617F. They reported a hemorrhagic diathesis due to acquired von Willebrand disease. Several reasons can explain these apparently contradictory results. Studies have shown the importance of the JAK2V617F / JAK2WT ratio for the MPN phenotype[49] and Etheridge et al used transplanted mice with a human JAK2V617F / mouse JAK2WT ratio of 1/5 in ECs, whereas we used a tamoxifen inducible mouse model that allows heterozygous expression of mouse JAK2V617F / JAK2WT specifically in ECs. Another main difference is the thrombosis models, as Etheridge et al used models inducing a disruption of the endothelial layer whereas we chose 3 models

maintaining an intact endothelial barrier. Of note, they reported an overall increase in the content of vWF in ECs, which is in accordance with our results.

Altogether, we believe that our work is clinically relevant for three reasons; (i) It suggests that specific biomarkers of EC activation should be intensively investigated to determine which MPN patients are at high thrombotic risk;(ii) It opens the route to new therapeutic options in MPN, such as hydroxyurea in patients with a high thrombotic risk or high endothelial activation markers, as well as anti-P-selectin antibody instead of or in addition to standard of care to prevent thrombosis in high risk MPN patients; and (iii) It provides the proof of concept that an acquired genetic mutation can alter the phenotype of ECs as shown for the acquired pro-thrombotic phenotype acquired upon expression of the JAK2 mutation. This suggests that other activating mutations in ECs could be causal in thrombotic disorders of unknown cause, which account for 50% of recurrent venous thrombosis.

Acknowledgments

The authors wish to thank Myriam Petit and Annabel Reynaud and Beatrice Jaspard-Vinassa for their assistance in histology, Beatrice Jaspard-Vinassa for her help with Western Blots, Jeremie Teillon for his help in image quantification, Veronique Ollivier for her assistance with in vitro flow experiments, Sylvain Grolleau for his help in mice genotyping, Olivier Mansier for his help with quantitative PCR, Jerome Guignard for his help with mice and vectorology platform for lentiviruses production (Inserm U1035). We are grateful to William Vainchenker (Institut Gustave Roussy, Inserm U1009), Pierre-Emmanuel Rautou (Inserm U970) and Jean-François Viallard (Inserm U1034) for helpful discussions. We are also grateful to the French Intergroup Myeloproliferative (FIM).

Sources of funding

This study was supported by research grants from ANR-DFG JAKPOT (N° ANR-14-CE35-0022-02), INSERM, The Fondation Bettencourt Schueller, the Aquitaine Region. AG was supported by research grant from INSERM (Poste Accueil INSERM) and VGL by ANR-DFG JAKPOT.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest

Author contributions

A.G. contributed to designing and performing experiments, analysis and interpretation of data, and preparing the manuscript. V.G.L contributed to designing and performing experiments,

analysis and interpretation of data, and preparing the manuscript. N.L.L., C.P., B.K., J.V.D. contributed to designing and performing experiments, analysis and interpretation of data. M.A.R contributed to performing experiments, analysis and interpretation of data. C.D., C.D., J.L.V. contributed to analysis and interpretation data. Y.B., M.J.P. and T.C. contributed to designing experiments, analysis and interpretation of data. C.J. contributed to supervising the study, designing experiments, analysis and interpretation of data, and preparing the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

References

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-2405.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005;365(9464):1054-1061.
3. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature. 2005;434(7037):1144-1148.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med. 2005;352(17):1779-1790.
5. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 2005;7(4):387-397.
6. Lu X, Huang LJ, Lodish HF. Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F. J Biol Chem. 2008;283(9):5258-5266.
7. Elliott MA, Tefferi A. Pathogenesis and management of bleeding in essential thrombocythemia and polycythemia vera. Curr Hematol Rep. 2004;3(5):344-351.
8. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. Blood. 2013;122(13):2176-2184.
9. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Exp Hematol. 2005;33(5):523-530.
10. Barbui T, Carobbio A, Rambaldi A, Finazzi G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? Blood. 2009;114(4):759-763.
11. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. Blood. 2007;109(6):2446-2452.
12. De Grandis M, Cambot M, Wautier MP, et al. JAK2V617F activates Lu/BCAM-mediated red cell adhesion in polycythemia vera through an EpoR-independent Rap1/Akt pathway. Blood. 2013;121(4):658-665.
13. Rosti V, Villani L, Riboni R, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. Blood. 2012;121(2):360-368.
14. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. Blood. 2009;113(21):5246-5249.
15. Teofili L, Martini M, Iachininoto MG, et al. Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2(V617F) mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2011;117(9):2700-2707.
16. Wakefield TW, Myers DD, Henke PK. Mechanisms of venous thrombosis and resolution. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008;28(3):387-391.
17. Kaneider NC, Forster E, Mosheimer B, Sturn DH, Wiedermann CJ. Syndecan-4-dependent signaling in the inhibition of endotoxin-induced endothelial adherence of neutrophils by antithrombin. Thromb Haemost. 2003;90(6):1150-1157.
18. Burns MP, DePaola N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005;288(1):H194-204.

19. Miszti-Blasius K, Debreceni IB, Felszeghy S, Dezso B, Kappelmayer J. Lack of P-selectin glycoprotein ligand-1 protects mice from thrombosis after collagen/epinephrine challenge. Thromb Res. 2011;127(3):228-234.
20. Severin S, Gratacap MP, Lenain N, et al. Deficiency of Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase 1 affects platelet responses and thrombus growth. J Clin Invest. 2007;117(4):944-952.
21. Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNalpha. Blood. 2013;122(8):1464-1477.
22. Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. Genesis. 2008;46(2):74-80.
23. Thambyrajah R, Mazan M, Patel R, et al. GFI1 proteins orchestrate the emergence of haematopoietic stem cells through recruitment of LSD1. Nat Cell Biol. 2016;18(1):21-32.
24. Wang L, Benedito R, Bixel MG, et al. Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow. EMBO J. 2013;32(2):219-230.
25. Chauhan AK, Kisucka J, Brill A, Walsh MT, Scheiflinger F, Wagner DD. ADAMTS13: a new link between thrombosis and inflammation. J Exp Med. 2008;205(9):2065-2074.
26. Wegmann F, Petri B, Khandoga AG, et al. ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. J Exp Med. 2006;203(7):1671-1677.
27. Yago T, Tsukamoto H, Liu Z, Wang Y, Thompson LF, McEver RP. Multi-Inhibitory Effects of A2A Adenosine Receptor Signaling on Neutrophil Adhesion Under Flow. J Immunol. 2015;195(8):3880-3889.
28. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. J Exp Med. 2012;209(4):819-835.
29. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol. 2007;7(9):678-689.
30. Almeida CB, Scheiermann C, Jang JE, et al. Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. Blood. 2012;120(14):2879-2888.
31. Andre P, Hartwell D, Hrachovinova I, Saffaripour S, Wagner DD. Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(25):13835-13840.
32. Zetterberg E, Verrucci M, Martelli F, et al. Abnormal P-selectin localization during megakaryocyte development determines thrombosis in the gata1low model of myelofibrosis. Platelets. 2014;25(7):539-547.
33. Etulain J, Martinod K, Wong SL, Cifuni SM, Schattner M, Wagner DD. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. Blood. 2015;126(2):242-246.
34. Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. Blood. 2014;123(18):2768-2776.
35. Kim KJ, Kwon SH, Yun JH, et al. STAT3 activation in endothelial cells is important for tumor metastasis via increased cell adhesion molecule expression. Oncogene. 2017.
36. Helman R, Pereira WO, Marti LC, et al. Granulocyte whole exome sequencing and endothelial JAK2V617F in patients with JAK2V617F positive Budd-Chiari Syndrome without myeloproliferative neoplasm. Br J Haematol. 2016.
37. Piaggio G, Rosti V, Corselli M, et al. Endothelial colony-forming cells from patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. Blood. 2009;114(14):3127-3130.

38. Yoder MC, Mead LE, Prater D, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. Blood. 2007;109(5):1801-1809.
39. Sozer S, Ishii T, Fiel MI, et al. Human CD34+ cells are capable of generating normal and JAK2V617F positive endothelial like cells in vivo. Blood Cells Mol Dis. 2009;43(3):304-312.
40. Cokic VP, Beleslin-Cokic BB, Tomic M, Stojilkovic SS, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea induces the eNOS-cGMP pathway in endothelial cells. Blood. 2006;108(1):184-191.
41. Cokic VP, Beleslin-Cokic BB, Noguchi CT, Schechter AN. Hydroxyurea increases eNOS protein levels through inhibition of proteasome activity. Nitric Oxide. 2007;16(3):371-378.
42. Charache S, Terrin ML, Moore RD, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. N Engl J Med. 1995;332(20):1317-1322.
43. Gangat N, Wolanskyj AP, McClure RF, et al. Risk stratification for survival and leukemic transformation in essential thrombocythemia: a single institutional study of 605 patients. Leukemia. 2007;21(2):270-276.
44. Finazzi G, Caruso V, Marchioli R, et al. Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. Blood. 2005;105(7):2664-2670.
45. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. Leukemia. 2013;27(9):1874-1881.
46. Matsui NM, Borsig L, Rosen SD, Yaghmai M, Varki A, Embury SH. P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium. Blood. 2001;98(6):1955-1962.
47. Ataga KI, Kutlar A, Kanter J, et al. Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. N Engl J Med. 2017;376(5):429-439.
48. Etheridge SL, Roh ME, Cosgrove ME, et al. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(6):2295-2300.
49. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood. 2008;111(8):3931-3940.

Figure legends

Figure 1. The presence of JAK2V617F in endothelial cells promotes thrombus formation. **(A)** In *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice, thrombus formation occurs spontaneously and is increased after weak platelet activation by low dose collagen plus epinephrine, and injection of TNF-alpha. **(B)** Carstairs staining of pulmonary thrombus in control mice (left) and *PDGFb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice (right) injected with TNF-alpha. Black arrows indicate thrombus. Transparent arrows indicate fibrin deposit. Scale bar: 500µm. **(C)** Thrombus is formed by neutrophils (green) and platelets (yellow). Nuclei are stained with DAPI (blue). The right picture is a magnification of the thrombus observed on the left image. Scalebar on the left image : 50 µM. Scale bar on the right image: 10µM. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. *P < 0.05; **P < 0.01.

Figure 2. JAK2V617F endothelial cells have normal anticoagulant activity. No statistical difference in the rate **(A)** and extent **(B)** of Tissue Factor-triggered thrombin generation at the surface of endothelial cells with or without TNF-alpha (n=3 for all conditions). **(C)** No statistical difference in the rate of thrombin-triggered Protein C activation at the surface of endothelial cells (n=3 for all conditions). No statistical difference in production of nitrite **(D)** and 6-keto Prostaglandin F1a **(E)** (n=3 for all conditions). Results are expressed as mean value +/- s.e.m. from 3 experiments. Statistical significance determined by Mann-Whitney test.

Figure 3. JAK2V617F endothelial cells have a pro-adhesive phenotype in vitro and in vivo. Normal mononuclear cells **(A)** and neutrophils **(B)** adhere more on HUVECs expressing JAK2V617F than JAK2WT under static conditions. HUVECs transduced with lentiviruses containing GFP alone were used as negative controls. Statistical significance determined by 1-way-ANOVA analysis of variance and post-hoc Tukey test. Results are expressed as mean value +/- s.e.m from 3 experiments. Under flow conditions, **(C)** adhesion of neutrophils is increased in

the presence of JAK2V617F HUVECs and neutrophils velocity **(D)** is reduced. Each dot represents one cell. Statistical significance determined by Student t-test. Results are expressed as mean value +/- s.e.m from 3 experiments. **(E)** Representative images of adhesion of neutrophils on JAK2WT and JAK2V617F HUVECs under flow conditions. **(F)** Representative images of leukocyte adhesion in mesenteric venules of control and *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice treated with TNF. Leukocyte rolling **(G)** and adhesion **(H)** are increased in mesenteric venules of *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice treated with TNF. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. *P < 0.05; ***P < 0.001. **** P < 0.0001.

Figure 4. P-Selectin expression is increased in JAK2V617F endothelial cells. (A) No modification of cell surface expression of ICAM-1, VCAM-1 and E selectin on JAK2V617F HUVECs. Statistical significance determined by Student t-test. Results are expressed as mean value +/- s.e.m from 3 experiments. **(B)** Representative images of P-Selectin staining (green) in carotid endothelial cells. Nuclei are stained with DAPI (blue) and VE-Cadherin in red. Scale bar: 50µm. **(C)** Cell surface expression of mouse P-selectin is increased in carotid endothelial cells from *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice whether or not they received TNF-alpha. Each dot represents one image, 4 images per mouse. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. **P < 0.01. **(D)** The ratio between soluble P-Selectin concentration and platelet count is significantly increased in *Pdgfb-iCreERT2;*$^{JAK2V617F/WT}$ mice. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. *P < 0.05.

Figure 5. Von Willebrand factor expression is increased in JAK2V617F endothelial cells. (A) Cell surface expression of vWF (red) is higher in JAK2V617F HUVECS (right) than in JAK2WT HUVECs (left). Nuclei are stained by DAPI (blue). Scale bar: 20µm. **(B)** JAK2V617F

HUVECs secrete more vWF than JAK2WT HUVECs in the absence or presence of TNF-alpha. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. Results are mean value +/- s.e.m from 3 experiments. **(C)** Plasma level of vWF Ag is increased in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Student t-test. *P < 0.05; *** P < 0.001.

Figure 6. Increased endothelial P-selectin expression is responsible for the pro-adhesive phenotype of JAK2V617F endothelial cells. Under static conditions, increased adhesion of normal mononuclear cells **(A)** and neutrophils **(B)** on JAK2V617F HUVECs is reversed in the presence of a P-selectin blocking antibody. Results are mean value +/- s.e.m from 3 experiments. In *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice, increased rolling **(C)** and adhesion **(D)** of leukocytes is abolished in the presence of a P-selectin blocking antibody. **(E)** Increased thrombus formation in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2$^{V617F/WT}$* mice is abrogated in the presence of a P-Selectin blocking antibody. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by 2-way ANOVA analysis of variance and Sidak post-hoc test. *P < 0.05; **P < 0.01; **** P < 0.0001.

Figure 7. Treatment with hydroxyurea decreases the pro-thrombotic and pro-adhesive phenotype of JAK2V617F endothelial cells in vitro and in vivo via inhibiting P-Selectin and vWF expression. (A) 15 day treatment with HU decreases TNF-induced thrombosis in the lungs of Pdgfb-iCreERT2;JAK2V617F/WT mice. Treatment with HU decreases rolling **(B)** and adhesion **(C)** of leukocytes on mesenteric venules in Pdgfb-iCreERT2;JAK2V617F/WT mice treated with TNF. Results expressed as are mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. *P < 0.05, ***P < 0.001. **(D)** Pre-treatment of JAK2V617F HUVECs with hydroxurea decreases static adhesion of neutrophils. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by 2-way ANOVA analysis of variance and Sidak post-hoc test. **(E)** 15 day treatment with HU leads to a diminution of the ratio of

soluble P-selectin/number of platelets in plasma of Pdgfb-iCreERT2;JAK2V617F/WT mice treated with TNF. **(F)** HU decreases the expression of P-selectin at the surface of carotid JAK2V617F endothelial cells. Each dot represents one image with 4 images per mouse (n=4). **(G)** Treatment of JAK2V617F HUVECs with hydroxyurea decreases secretion of vWF. Results are expressed as mean value +/- s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test. *P < 0.05.

Figure 1

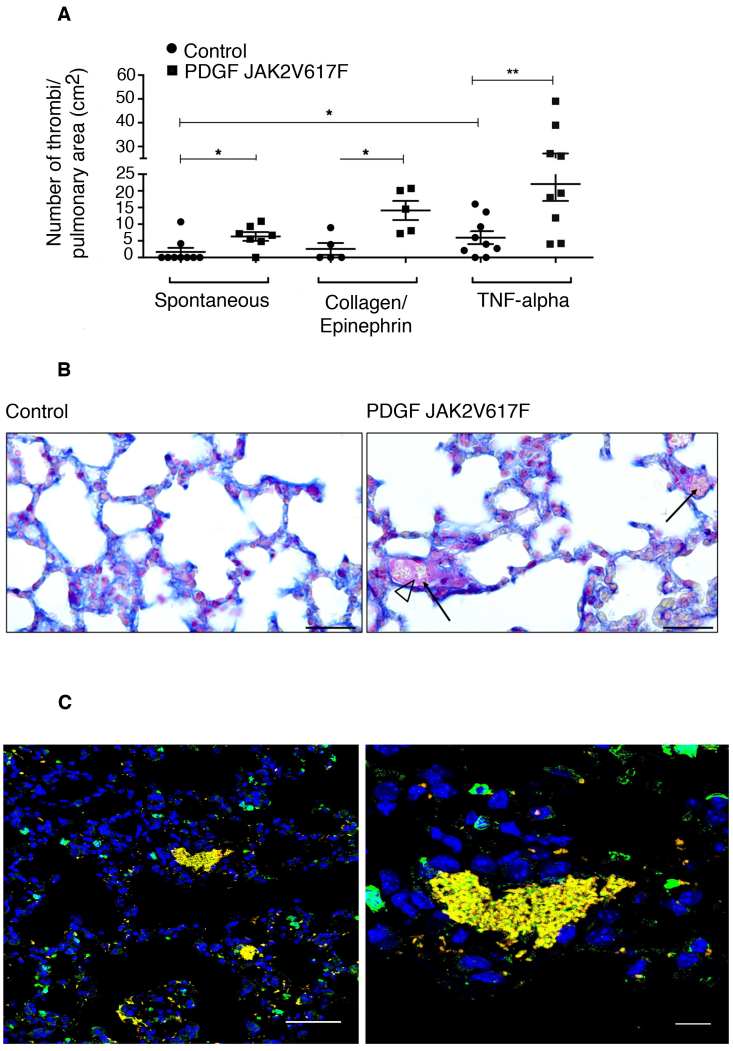

A
Control
PDGF JAK2V617F
Number of thrombi/ pulmonary area (cm2)
60
50
40
30
25
20
15
10
5
0
*
*
*
**
Spontaneous
Collagen/ Epinephrin
TNF-alpha
B
Control
PDGF JAK2V617F
C

Figure 2

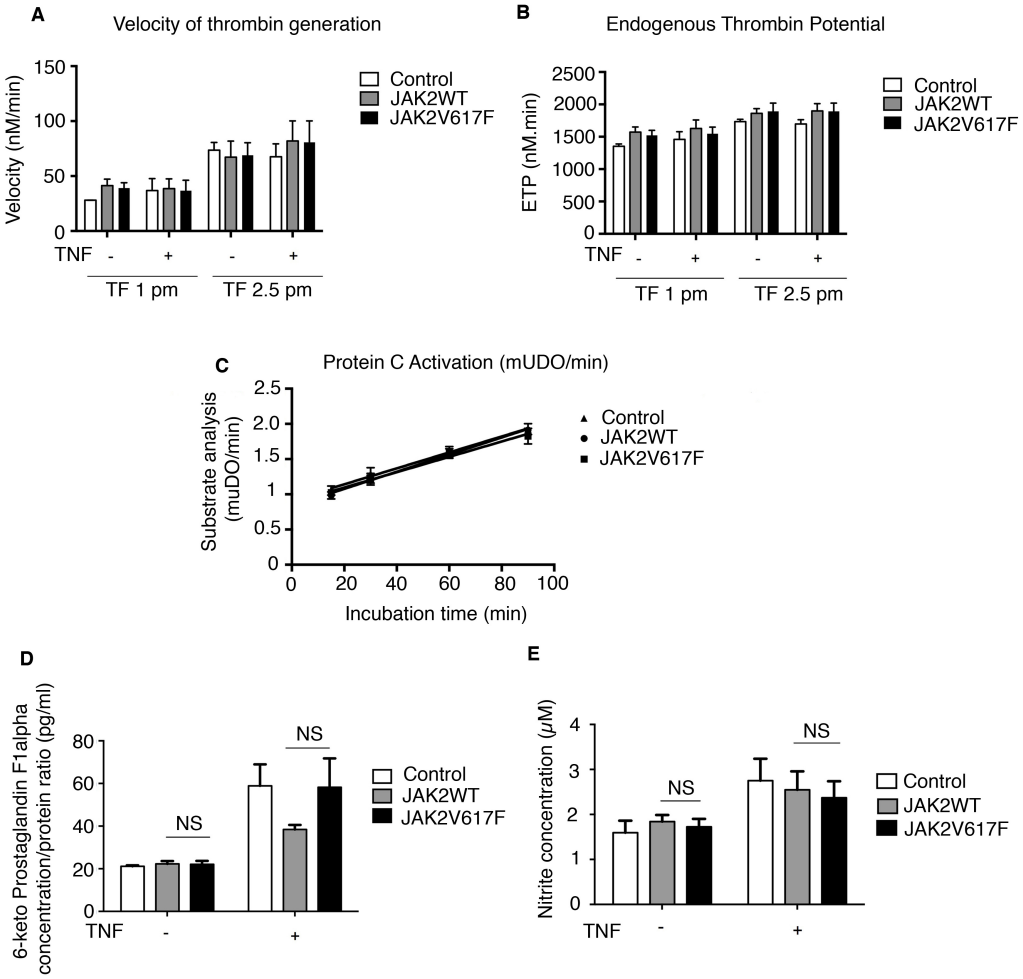

A
Velocity of thrombin generation
Velocity (nM/min)
150
100
50
0
TNF - + - +
TF 1 pm
TF 2.5 pm
Control
JAK2WT
JAK2V617F
B
Endogenous Thrombin Potential
ETP (nM.min)
2500
2000
1500
1000
500
0
TNF - + - +
TF 1 pm
TF 2.5 pm
Control
JAK2WT
JAK2V617F
C
Protein C Activation (mUDO/min)
Substrate analysis (muDO/min)
2.5
2.0
1.5
1
0.5
0
0 20 40 60 80 100
Incubation time (min)
Control
JAK2WT
JAK2V617F
D
6-keto Prostaglandin F1alpha concentration/protein ratio (pg/ml)
80
60
40
20
0
NS
NS
TNF - +
Control
JAK2WT
JAK2V617F
E
Nitrite concentration (μM)
4
3
2
1
0
NS
NS
TNF - +
Control
JAK2WT
JAK2V617F

Figure 3

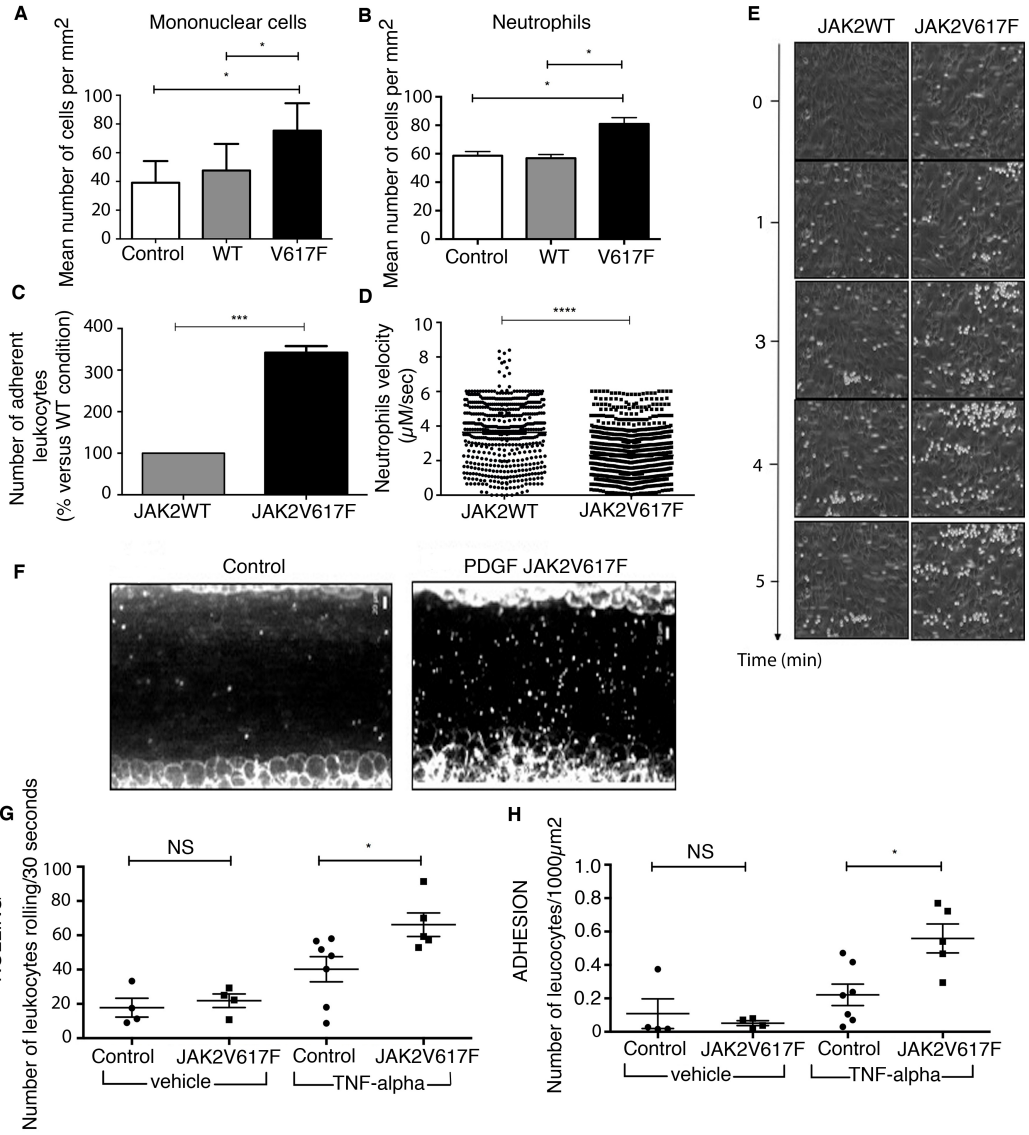

A
Mononuclear cells
Mean number of cells per mm2
Control
WT
V617F
B
Neutrophils
Mean number of cells per mm2
Control
WT
V617F
C
Number of adherent leukocytes (% versus WT condition)
JAK2WT
JAK2V617F
D
Neutrophils velocity (μM/sec)
JAK2WT
JAK2V617F
E
JAK2WT
JAK2V617F
Time (min)
F
Control
PDGF JAK2V617F
G
ROLLING
Number of leukocytes rolling/30 seconds
NS
Control
JAK2V617F
vehicle
TNF-alpha
H
ADHESION
Number of leucocytes/1000μm2
NS
Control
JAK2V617F
vehicle
TNF-alpha

Figure 4

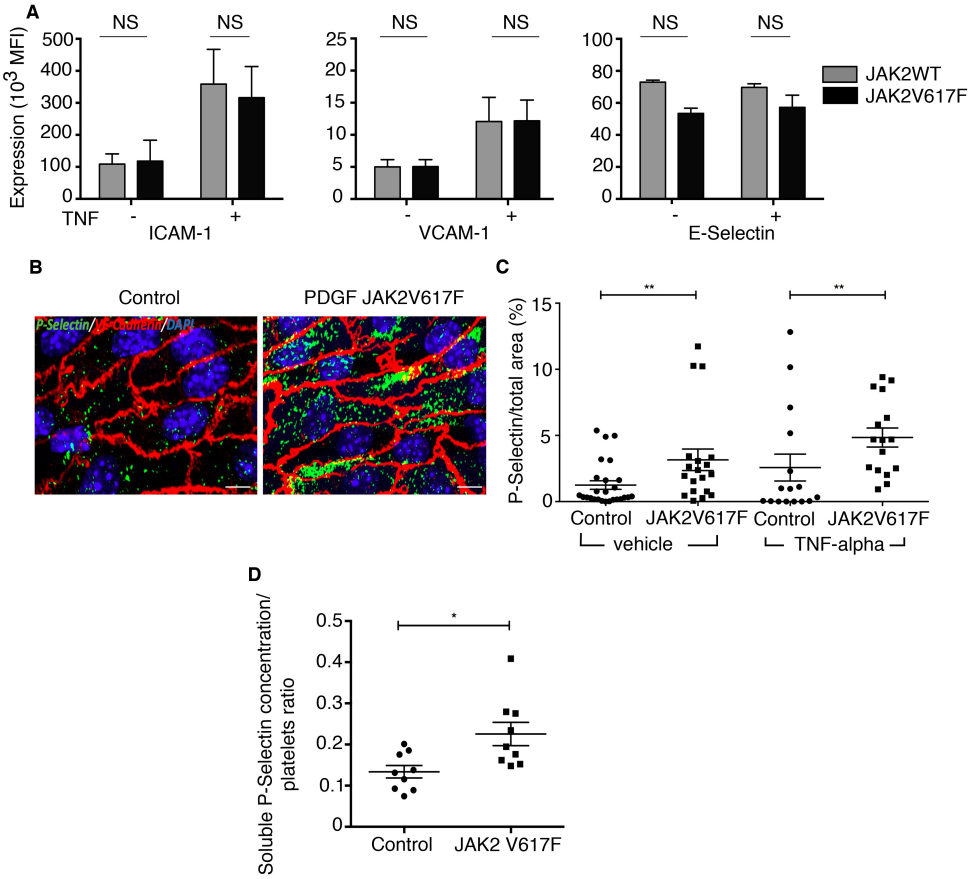

A
NS
NS
Expression (10^3 MFI)
500
400
300
200
100
0
TNF
-
+
ICAM-1
25
20
15
10
5
0
VCAM-1
100
80
60
40
20
0
E-Selectin
JAK2WT
JAK2V617F
B
Control
PDGF JAK2V617F
P-Selectin/ CD41/DAPI
C
P-Selectin/total area (%)
15
10
5
0
**
**
Control
JAK2V617F
Control
JAK2V617F
vehicle
TNF-alpha
D
Soluble P-Selectin concentration/ platelets ratio
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
Control
JAK2 V617F

Figure 5

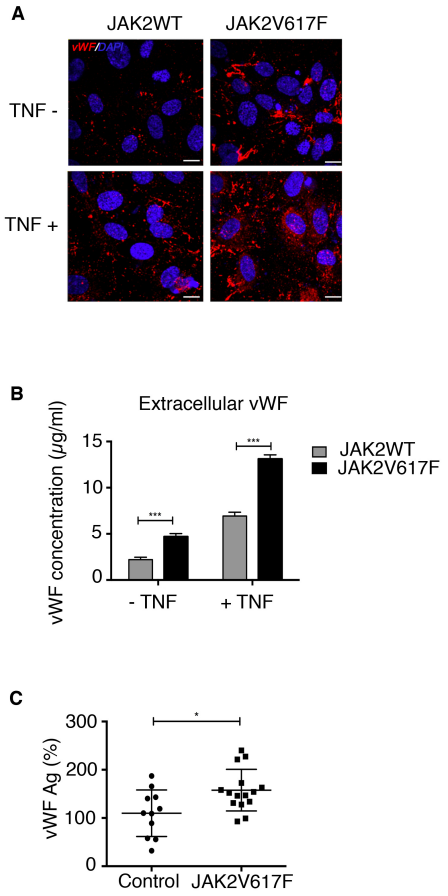

A
JAK2WT
JAK2V617F
vWF/DAPI
TNF -
TNF +
B
Extracellular vWF
vWF concentration (µg/ml)
15
10
5
0
***
***
JAK2WT
JAK2V617F
- TNF
+ TNF
C
vWF Ag (%)
300
200
100
0
*
Control
JAK2V617F

Figure 6

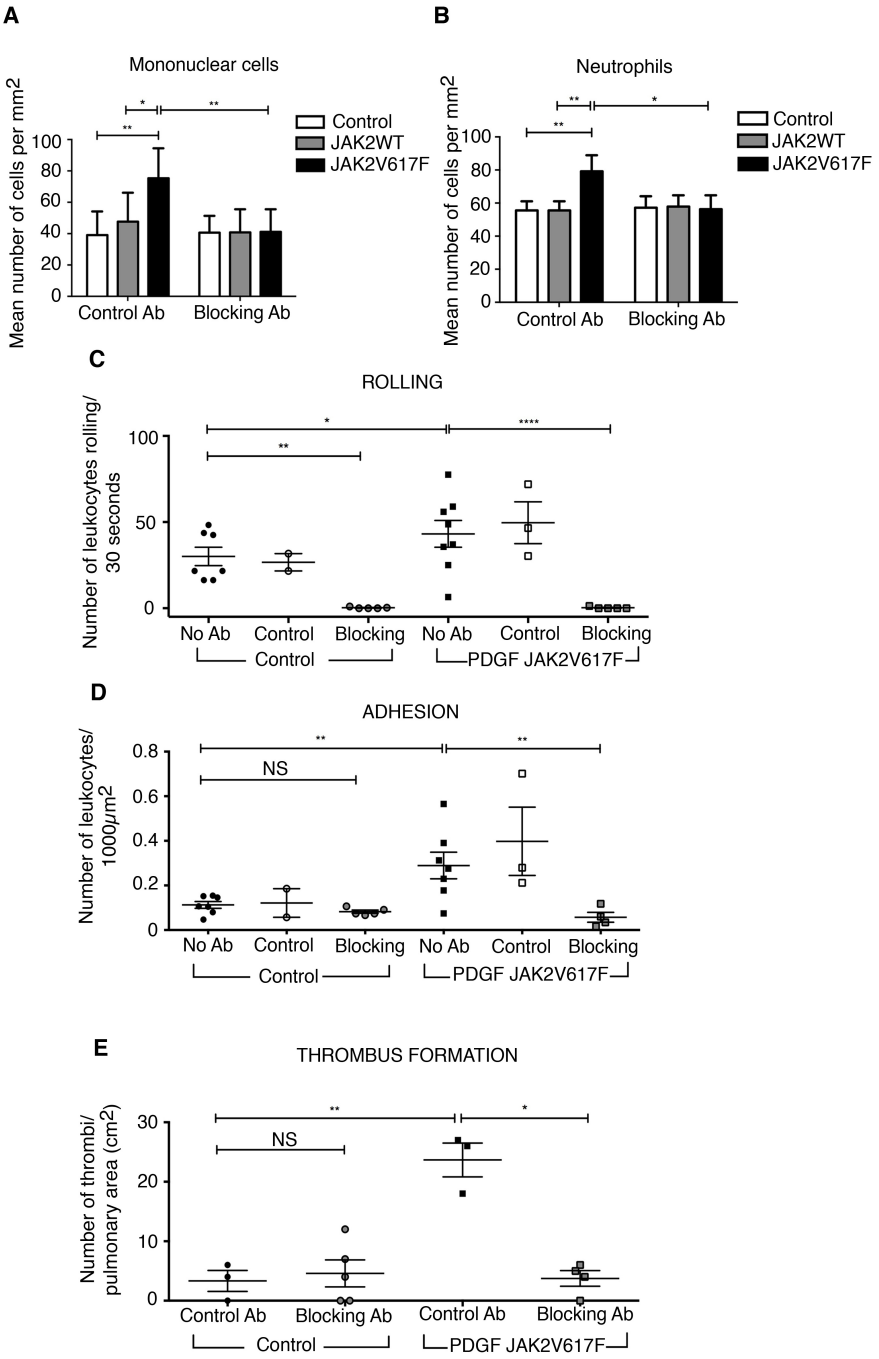
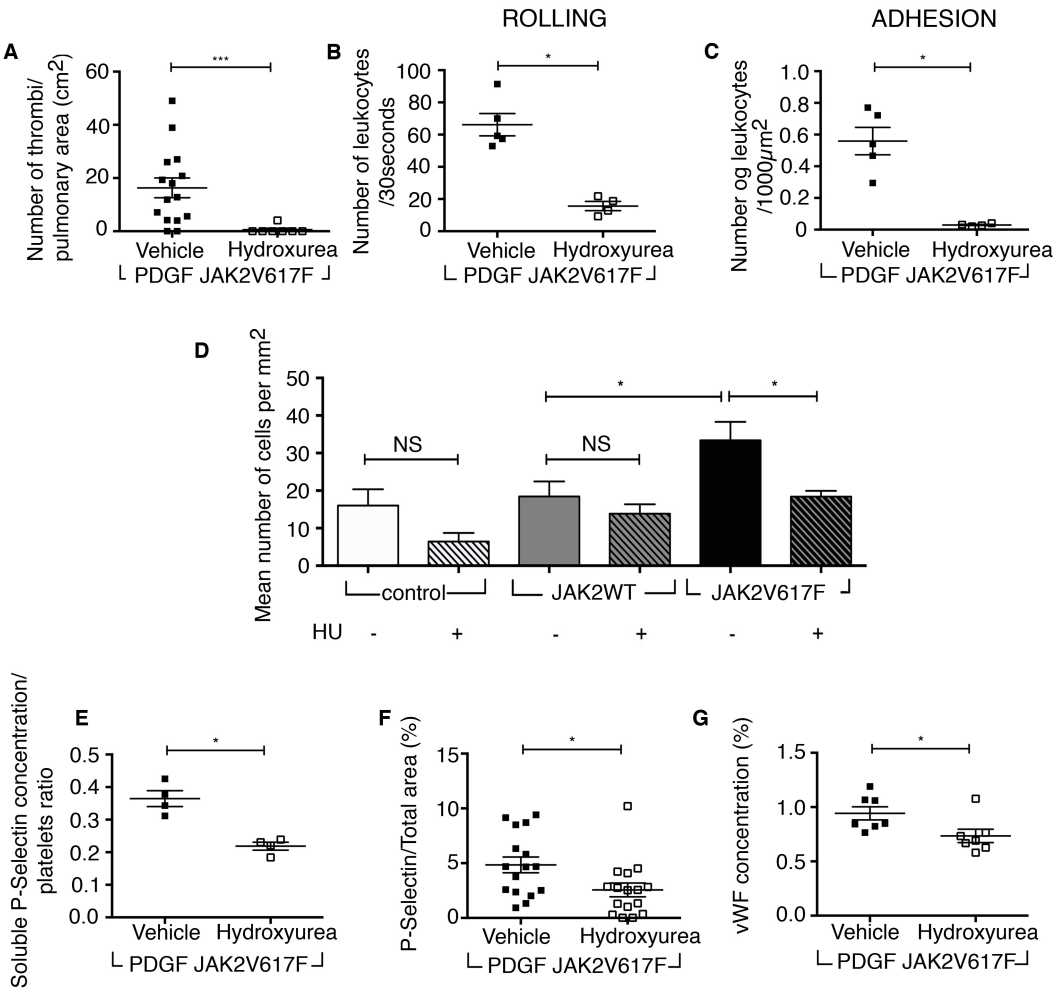

A
Mononuclear cells
Mean number of cells per mm2
Control
JAK2WT
JAK2V617F
Control Ab
Blocking Ab
B
Neutrophils
Mean number of cells per mm2
Control
JAK2WT
JAK2V617F
Control Ab
Blocking Ab
C
ROLLING
Number of leukocytes rolling/ 30 seconds
No Ab
Control
Blocking
No Ab
Control
Blocking
Control
PDGF JAK2V617F
D
ADHESION
Number of leukocytes/ 1000μm2
NS
No Ab
Control
Blocking
No Ab
Control
Blocking
Control
PDGF JAK2V617F
E
THROMBUS FORMATION
Number of thrombi/ pulmonary area (cm2)
NS
Control Ab
Blocking Ab
Control Ab
Blocking Ab
Control
PDGF JAK2V617F

Figure 7


A
Number of thrombi/ pulmonary area (cm2)
60
40
20
0
***
Vehicle
Hydroxurea
PDGF JAK2V617F
B
ROLLING
Number of leukocytes /30seconds
100
80
60
40
20
0
*
Vehicle
Hydroxyurea
PDGF JAK2V617F
C
ADHESION
Number og leukocytes /1000μm2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
Vehicle
Hydroxyurea
PDGF JAK2V617F
D
Mean number of cells per mm2
50
40
30
20
10
0
NS
NS
*
*
control
JAK2WT
JAK2V617F
HU - + - + - +
E
Soluble P-Selectin concentration/ platelets ratio
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
*
Vehicle
Hydroxyurea
PDGF JAK2V617F
F
P-Selectin/Total area (%)
15
10
5
0
*
Vehicle
Hydroxyurea
PDGF JAK2V617F
G
vWF concentration (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Vehicle
Hydroxyurea
PDGF JAK2V617F

Supplemental methods

Cell culture/Lentivirus transduction

Human umbilical venous endothelial cells (HUVECs, Lonza, Basel, Swiss) were cultured in EGM-2 media (Lonza, CC-3156) supplemented with EGM-2 Single Quots (Lonza, CC-4176). Cells were transduced at a multiplicity of infection of 20 with GFP positive lentiviruses encoding human JAK2V617F, human JAK2WT, or GFP alone as negative control. HUVECs were used between passage 5 and passage 7.

Thrombin generation

Thrombin generation was measured in freshly prepared platelet free plasma, according to the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) method (Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands). Thrombin generation was performed in 96-well plates containing confluent HUVECs washed with HEPES buffer (20 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mg/ml BSA, pH 7,35). Thrombin generation was triggered by tissue factor (1 or 2.5 pM final concentration).

Protein C activation

Confluent HUVECs in 96-well plates were washed twice with warm sterile PBS and then incubated with thrombin (2 nM thrombin) and CaCl2 (2.5 mM) for 10 min at 37°C. Protein C was then added to each well at a final concentration of 0.2 μM. The plate was further incubated for different times at 37°C. Aliquots were collected and transferred to a clean 96-well plate. Hirudin (100 U/ml) was added to block thrombin. Activated protein C activity was monitored during 30 minutes at 405 nm on a FLUOStar Optima plate reader (BMG Labtech GMBH, Ortenberg, Germany) using a specific substrate (PNAPEP™ 1566, 100 μL at 0.4 mM). Results were plotted as the rate of substrate hydrolysis over time.

Nitrite and 6-keto Prostaglandin F1-alpha quantification

HUVECs were platted in 24 wells plates to reach confluence. Experiments were performed in the absence or presence of TNF-alpha (Merck Millipore). Nitrite quantification was performed following manufacturer's instructions with the Nitrate/Nitrite colorimetric assay (Cayman chemical, ref: 78001). Prostaglandin quantification was performed following manufacturer's instructions using the 6-keto-prostaglandin F1a kit (Cayman Chemical, ref: 515211).

Video analysis and quantification of leukocytes rolling and adhesion

Rolling leukocytes were quantified by counting the number of rhodamin-marked cells passing a given plane perpendicular to the vessel axis in a 30 second interval. Adherent leukocytes were quantified by counting the number of rhodamin-marked cells motionless during a 30 second interval. The results were expressed as number of rolling leukocytes per 30 seconds. Leukocyte adhesion results were expressed as a ratio of adherent cells/vessel surface (cm2). Video analyses were performed using ZEN imaging software. Leukocytes rolling and adhesion quantification were performed in a blinded fashion, by two independent observers.

Study of adhesion molecules on HUVECs

Transduced HUVECs were platted in 6-well plates to reach confluence. Before the experiment, conditioned medium with or without 10 ng/ml TNF-alpha was added for 4 hours. HUVECs were then washed twice with warm sterile PBS and incubated during 10 minutes with accutase. After two washes with PBS, cells were incubated with anti-ICAM-1 antibody (PE mouse anti-human CD54, HA-58 clone, BD Pharmingen), anti-VCAM-1 antibody (APC mouse anti-human CD106, 51-10C9 clone, BD Pharmingen) and anti-E-Selectin antibody (PE mouse anti-human CD62E, 68-5H11 clone, BD Pharmingen) during 30 minutes and flow cytometry was performed.

Generation and characterization of Pdgfb-iCreERT2;JAK2V617F/WT mice

Conditional heterozygous JAK2V617F/WT knock-in (JAK2V617F KI) mice have been previously described (1). Pdgfb-iCreERT2;JAK2V617F/WT mice were generated by crossing JAK2V617F KI mice with Pdgfb-iCreERT2 transgenic mice (2), allowing tamoxifen-inducible expression of JAK2V617F in endothelium. Pdgfb-iCreERT2-negative; JAK2V617F/WT littermate mice were used as controls. Mutant mice were analysed 15-20 days after tamoxifen administration. Adult mice were genotyped by PCR using the P1/P2 primer set for the wild-type allele and for the JAK2 Flex allele: P1: 5'-GTCTGTCCAAAGAGTCTGTAAGTAC- 3'; P2: 5' : GCTCCAGGGTTACACGAGTC- 3'. For PDGF Cre-recombinase, forward primer: 5'-CCAGCCGCCGTCGCAACT-3', and reverse primer: 5'-GCCGCCGGGATCACTCTCG-3' 24 were used. Haematocrit, hemoglobin level, platelet, and white cells count were determined using an automated counter (scil Vet abc Plus+).

Histology

To quantify thrombus formation in mice, we used Carstairs staining allowing visualization of platelets, red blood cells and fibrin. Slides were hydrated in xylol and ethanol to distilled water, followed by incubation in 5% ferric ammonium sulfate for 5 min, washing, and staining with Mayer hematoxylin for 5 min and Picric Acid-orange G solution for 1 hour. After washing, slides were stained with 1% phosphotungstic acid for 10 min, Ponceau Fuchsin solution for 7 min, washed, and 1% phosphotungstic acid for 10 minutes. After washing, slides were stained with Anilin blue solution for 30 min, and rinsed in distilled water. Slides were dehydrated and covered with a coverslip using mounting medium. Presence of thrombi was assessed by fibrin deposit in thrombi. Thrombus quantification was performed using an optical microscope and the pulmonary area was measured to perform thrombi number/pulmonary area (number of thrombi/cm2) ratio. Immunostaining of platelets and neutrophils was performed using polyclonal anti-PF4 antibody (Peprotech, 500-P05) and anti-Ly6G monoclonal antibody (1A8 clone) respectively. Three slides per mouse were analysed in a blinded fashion, by two independent observers.

Quantification of VWF in HUVECs and supernatant

HUVECs were seeded in 12 well plates (Costar), and at confluence, they were washed with 500 µL of PBS (Gibco). 500 µL of medium was added. 10ng/ml TNF-alpha was added (or not) for 24 hours) (Merck Millipore). Supernatant was then removed, centrifuged at 12000 g for 5 minutes and stored at -80°C for later quantification of secreted vWF. To quantify intracellular vWF, cells were washed with PBS before adding 500 µL PBS and removed with a scrapper. Liquid was removed and 5 cycles of freezing and thawing were performed. Finally, the intracellular lysates were centrifuged at 12000 g for 5 minutes and stored at -80°C. vWF was quantified using a previously published method (3). Ninety-eight well plates (Greiner, Flat Bottom) were coated with anti-vWF antibody (DAKO, A0082) diluted at 1/660 in a coating buffer overnight at 4°C. After washing and blocking, a sample of HUVEC supernatant and intracellular lysate were added to wells. Control wells were treated with platelet poor plasma from a healthy donor. After 2 hours and a second wash, anti-vWF antibody coupled to HRP (DAKO, P0226) diluted at 1/6000 in wash buffer was added to wells. After 2 hours and a third wash, HRP was revealed with an OPD and H202 solution. After 2 minutes of coloration, the reaction was blocked with a H2S04 3M solution and results were read at 492nnm with an OPTIMA plate reader.

Von Willebrand Factor (vWF) and P-selectin immunostaining

Immunofluorescence analyses were performed on HUVECs, treated with or without TNF-alpha (10ng/ml overnight). For vWF staining, cells were fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 10 minutes and, after saturation in 5% bovine serum albumin for 1 hour, incubated with rabbit anti-human vWF (Merck Millipore) primary antibody, and resolved with Alexa Fluor 588 conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, California). Cells were mounted with Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, California), imaged with a confocal microscope (Zeiss LSM 700) and

analysed by Imaris software (Bitplane). In mice, P-Selectin immunostaining was performed in carotid arteries of PDGFb-iCreERT2;JAK2V617F/WT and control mice.

In vitro and in vivo study of the effects of hydroxyurea on endothelial cells

In vitro, HUVECs were treated with hydroxyurea (HU) (Sigma-Aldrich, H8627) for 24 hours at a concentration of 100 µM, then washed three times with EGM2 medium. Neutrophil static adhesion was performed as previously described. In vivo, Pdgfb-iCreERT2;JAK2V617F/WT and control mice were treated with HU at a dose of 200 mg/kg/day (using oral gavage) for 10 days prior to any experiment.

RNA extraction and real-time qPCR

RNA were prepared using Trizol reagent as recommended by the manufacturer. RNA were then treated with RNAse-free DNAse (Promega, reference: M610A). For P-selectin mRNA quantification, complementary DNA (cDNAs) were synthetized from 1 µg of RNA, using the M-MLV reverse transcriptase (Promega, reference: M1708) according to manufacturer instructions. The real time quantitative PCR (qRT-PCR) was performed using One-Step SYBR® Green qRT-PCR Kit for iQ (Quantabio) on a AriaMx thermocycler (Agilent). Data were analyzed by the 2-ΔΔCt method (4) with the reference gene GAPDH. The sequence of the primers used were: P-selectin : 5'-CTGCCAAGCAGGACCATTGA and 5'-AGGACTCGGGTCAAATGCAG, GAPDH: 5'-AGGTGAAGGTCGGAGTCAACG and 5'-GCTCCTGGAAGATGGTGATGG.

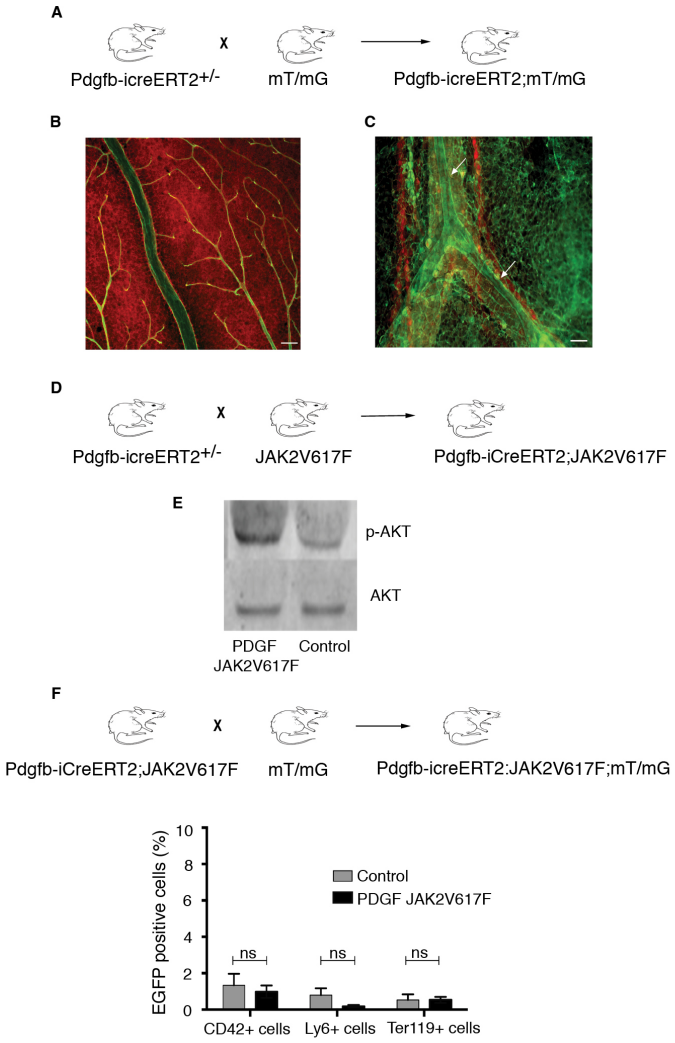
Supplemental references

1. 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 IFNalpha. Blood. 2013 Aug 22;122(8):1464-77.

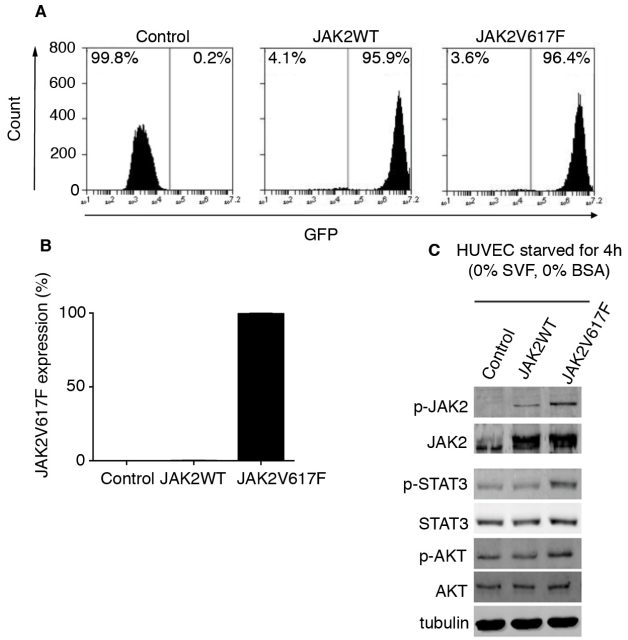
2. Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. Genesis. 2008 Feb;46(2):74-80.

3. Rayes J, Hollestelle MJ, Legendre P, Marx I, de Groot PG, Christophe OD, et al. Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. Blood. 2010 Jun 10;115(23):4870-7.

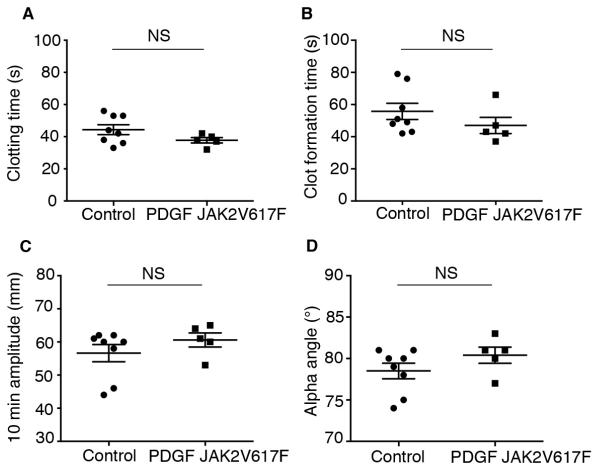
4. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods 25, 402–408 (2001).



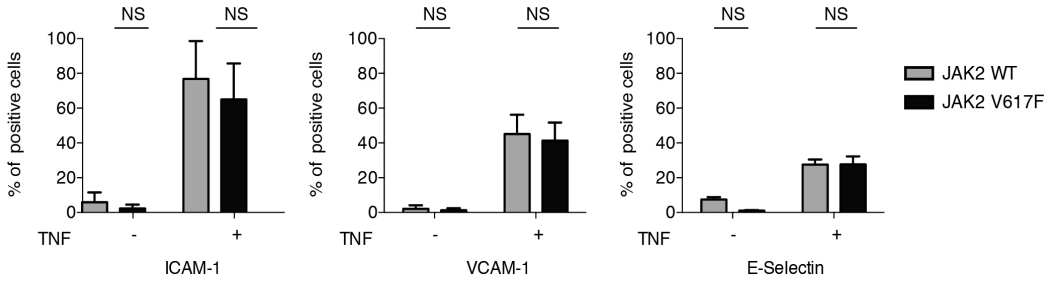
Supplemental Figure 1. Characterization of *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. (A) *Pdgfb-iCreERT2* were crossed with *mT/mG* mice to obtain *Pdgfb-iCreERT2;mT/mG* mice. Efficient endothelial recombination after oral administration of tamoxifen in the retina **(B)** and mesentery **(C)** of *Pdgfb-iCreERT2;mT/mG* mice. White arrows indicate GFP positive endothelium. **(D)** Conditional JAK2V617F$^{WT/Flex}$ mice were crossed with *Pdgfb-creERT2* mice for tamoxifen-inducible adult expression of JAK2V617F in endothelial cells. **(E)** AKT phosphorylation is increased in lung endothelial cells from *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. **(F)** *Pdgfb-icreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice were crossed with *mT/mG* mice to obtain *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$*; mT/mG* mice. Flow cytometry analysis did not reveal any expression of the Cre in granulocytes (Ly6+), platelets (CD42+) and red blood cells (Ter119+) in *Pdgfb-iCreERT2;mT/mG;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice 20 days after oral tamoxifen administration. Results are mean value +/- s.e.m from 5 mice per genotype. Statistical significance by Mann-Whitney-test.



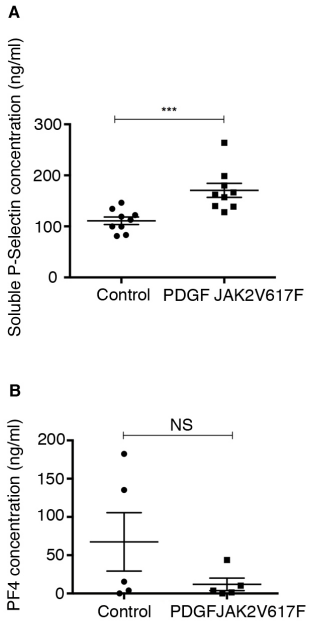
Supplemental Figure 2. **(A)** Expression of GFP up to 95% in JAK2WT and JAK2V617F HUVECs. **(B)** Measurement of JAK2V617F allelic burden in HUVEC transduced either with control, JAK2WT or JAK2V617F lentiviruses. **(C)** Studies of JAK2, STAT3 and AKT phosphorylation by western blotting in HUVECs overexpressing JAK2WT or JAK2V617F.



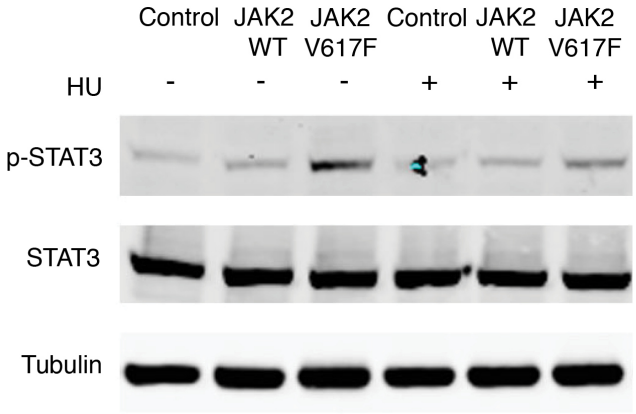
Supplemental Figure 3. Coagulation parameters of control and *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice evaluated by thromboelastometry. **(A)** Clotting time is not different between *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and control mice. **(B)** Clot formation time is not different between *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and control mice. **(C)** Ten minute amplitude is not different between *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and control mice. **(D)** Alpha angle is not different between *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and control mice. Results are expressed as mean value ± s.e.m. Statistical significance determined by Mann-Whitney test.



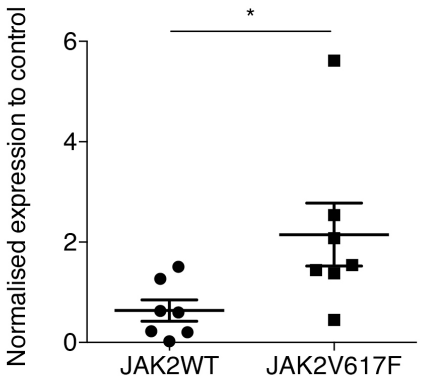
Supplemental Figure 4. No difference of ICAM-1, VCAM-1 and E-Selectin expression between JAK2WT and JAK2 V617F HUVEC. Results expressed as percentage of positive cells, mean and SEM. Statistical significance by Mann-Whitney test.



Supplemental Figure 5. (**A**) Soluble P-Selectin concentration is higher in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. (**B**) PF4 concentration is not different in *Pdgfb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and control mice. Results are mean value +/- s.e.m. Statistical significance by Mann-Whitney test. *** $P < 0.005$.



Supplemental Figure 6. Effect of hydroxyurea (HU) administration on STAT3 and p-STAT3 expression in control, JAK2 WT and JAK2 V617F HUVEC. Administration of Hydroxyurea at the concentation of 100μM during 24 hours lead to a decrease in p-STAT3 expression.



Supplemental Figure 7. P-Selectin RNA expression is increased in JAK2V617F HUVEC. HUVECs were transduced with lentivirus vectors carrying the cDNA of JAK2 WT or V617F or an empty vector. Six days after transduction, RNAs were extracted for evaluation of P-selectin expression. Results are expressed as the expression of P-selectin on GAPDH expression and normalised on the empty-vector control condition according to the 2-ΔΔCt method (n= 3). Statistical significance by Mann-Whitney test. * $P < 0.05$.

Supplemental Table 1

	Control	PDGF JAK2V617F	
Platelets (10^3/mm^3)	1074 +/- 52.94	1106 +/- 64.92	*p = 0.72*
Leukocytes (10^3/mm^3)	4.94 +/- 0.68	4.37 +/-0.60	*p = 0.49*
Hemoglobin (g/dl)	11.68 +/-0.25	11.44 +/- 0.23	*p = 0.49*
Hematocrit (%)	37.96 +/- 0.90	36.37 +/- 0.79	*p = 0.20*

<u>Article 2</u> : Les biomarqueurs de NET comme des facteurs de risque de thrombose associée aux néoplasies myéloprolifératives

Article en préparation

L'objectif de ce travail était d'étudier le phénomène de formation de neutrophil extracellular traps (NET) chez les patients avec néoplasie myéloproliférative (NMP) et mutation JAK2V617F. En effet, les données disponibles dans la littérature nous indiquent que les polynucléaires neutrophiles (PNN) de patients avec NMP sont activés. De plus, des études récentes mettent en lumière le rôle crucial de la formation de NET dans la physiopathologie de la thrombose veineuse et artérielle. Notre hypothèse était donc que les patients avec NMP JAK2V617F positif avaient une formation de NET accrue, participant à la physiopathologie de la thrombose au cours de ces maladies.

Nous avons analysé une cohorte de patients avec NMP JAK2V617F, naïfs de tout traitement cytoréducteur, et quantifié les marqueurs de NET chez ces patients.

53 patients (33 avec thrombocytémie essentielle (TE), 12 avec Polyglobulie de Vaquez (PV) et 8 avec myélofibrose (MF)) ont été recrutés entre 2015 et 2018. Comme montré dans de précédentes études, nous avons mis en évidence une activation des PNN (augmentation d'expression de CD11b et de facteur tissulaire) chez les patients avec NMP par rapport au groupe contrôle, sans retrouver de différence entre les patients sans antécédents de thrombose et ceux avec. Dans un second temps, nous avons analysé la formation de NET ex-vivo après isolement des PNN de patients et constaté une augmentation de la formation de NET de manière spontanée. La production de ROS étant un phénomène crucial au cours de la NETose, nous avons quantifié la production de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygene species, ROS) dans les PNN de patients et constaté une augmentation de la production de ROS chez les patients avec NMP. Afin d'analyser la formation de NET de manière « indirecte », nous avons enfin quantifié les taux plasmatiques d'ADN et de MPO-ADN et mis en évidence une augmentation des taux d'ADN et de MPO-ADN. De manière intéressante, nous avons constaté que les taux de MPO-ADN étaient augmentés chez les patients avec antécédents de thrombose, suggérant une participation de la formation de NET dans la survenue de thrombose chez les patients avec NMP.

Au total, ce travail a permis de mettre en évidence une augmentation de la formation de NET chez les patients avec NMP. De plus, nos données montrent que le taux de MPO-ADN est associé à un antécédent de thrombose chez les patients avec NMP, suggérant son utilisation comme biomarqueur de survenue de thrombose chez les patients avec NMP.

NETs biomarkers as risk factors for MPN-associated thrombosis

Alexandre Guy[1*] ; Simon Favre[1*] ; Sylvie Colomer[1,3] ; Laure Deloison[1] ; Virginie Gourdou-Latyszenok[1] ; Marie-Ange Renault[1] ; Etienne Rivière[1,2] ; Chloé James[1,3]

[*:] contributed equally to this work

[1] Univ. Bordeaux, Inserm, UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France

[2] CHU de Bordeaux, Service de Médecine Interne, F-33600 Pessac, France

[3] CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie, F-33600 Pessac, France

Address correspondence to: Chloe James, INSERM UMR 1034, CHU Haut-Lévêque, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac. Phone: +33-5-57-89-19-79; E-mail: chloe.james@inserm.fr.

Key words: Thrombosis/ Myeloproliferative neoplasms/ Neutrophils/ NETosis

Abstract

Thrombosis is the main cause of morbidity and mortality in patients with myeloproliferative neoplasms (MPN). These last years, the implication of neutrophils and neutrophil extracellular traps (NET) in the physiopathology of thrombosis has been extensively studied. In patients with MPN, neutrophils are activated and recent studies showed increased NET formation during these diseases, leading to thrombosis in JAK2V617F mice. We aimed to study NET formation in MPN patients with JAK2V617F mutation, and analysed different NET formation markers in a cohort of MPN patients.

We analysed a cohort of 53 MPN patients without cytoreductive therapy and quantified NET markers in these patients. As previously shown, we confirmed neutrophil activation in MPN, with increased expression of CD11b and tissue factor at the surface of neutrophils. We next quantified ex-vivo NET formation and demonstrated a spontaneous increased NET formation from neutrophils isolated from MPN patients, versus control patients. Reactive oxygene species (ROS) production was also increased in MPN neutrophils. Lastly, we quantified different NET biomarkers and found increased plasmatic DNA and MPO-DNA levels in MPN patients versus controls. Interestingly, we demonstrated that MPO-DNA plasmatic level was increased in patients with history of thrombosis versus patients without, suggesting an implication of NET formation in the physiopathology of thrombosis in MPN patients.

Altogether, our results confirmed that NET formation is increased in MPN patients. More, in a cohort of 47 MPN patients free from cytoreductive therapy, we demonstrated that neutrophils from MPN patient are spontaneously prone to form NET. We also highlight a potential marker of thrombosis in MPN patients, MPO-DNA concentration, marker which need to be further examined in a larger cohort of patients.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are acquired hematopoietic stem cell diseases, with increased production of mature blood cells. Philadelphia (Ph) negative MPN include Polycythemia Vera (PV) with increased red blood cells, Essential Thrombocythemia (ET) with increased platelet count and Primitive Myelofibrosis (PMF). The most frequent molecular abnormality found in Ph negative MPN is *JAK2V617F*, an activating mutation of *JAK2* that is responsible for constitutive signalling of various cytokine receptors. The most frequent complication in MPN is thrombosis, which can occur at diagnosis or during follow-up. In 80% of cases, they are arterial but they can also be venous and of note, venous thrombosis can be localized in atypical sites such as the splanchnic territory (Budd Chiari syndrom and portal thrombosis) and cerebral veins. Assessing the thrombotic risk is of great importance, as the main goal of treatments in PV and ET is to lower the risk of thrombosis. Currently, risk factors for thrombosis in ET and PV are age over 60 and history of previous thrombosis. In ET, two other factors, i.e. the presence of JAK2V617F and cardiovascular risk factors have been added within the IPSET Thrombosis Score[1]. Nevertheless, these scores are still unable to accurately predict the individual thrombotic risk, especially in young patients. There is thus a need to find new risk factors for thrombosis.

These last ten years have revealed that neutrophils, in certain settings, can dismantle and expel nuclear DNA together with neutrophil markers, thus forming Neutrophil Extracellular Traps (NETs). These NETs not only trap bacteria[2] but also promote activation of platelets[3], extrinsic and intrinsic pathways of coagulation and inhibit fibrinolysis[4], thus promoting thrombosis[5]. Very recently, increased NET formation was reported in MPN patients, and was associated with occurrence of thrombosis in a MPN mouse model[6]. We thus hypothesized that NET biomarkers could be efficient biological risk factors for MPN-related thrombosis. Therefore, the aim of our study was to assess different markers of neutrophil activation, including various biomarkers of

NETosis, in patients with newly diagnosed overt MPN with or without thrombotic complications, and in controls without MPN.

Methods

Study population

From 2015 to 2018, 53 newly diagnosed MPN patients (15 males and 38 females, age range: 18-86 years olds) were enrolled at the University Hospital of Bordeaux and Institut Bergonie (Bordeaux, France), after giving informed consent. MPN diagnoses were made according to WHO 2008 criteria[7]. Twenty six healthy subjects (7 males and 19 females, age range: 21-40 years old) without history of thrombohemorrhagic events were included as a control group. None of the study subject was taking oral contraceptive or hormone replacement therapy at the time of blood sampling. All investigations were approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes Sud Ouest et Outre Mer III DC 2015/94). The procedures are in accordance with the Declaration of Helsinki of 1975, revised in 2000.

Blood collection and plasma preparation

Blood was collected into sterile EDTA for NET quantification and cytofluorimetric studies, or trisodium citrate (0.129 M, 1:9 vol:vol) for coagulation studies, MPO-DNA and DNA quantification. Platelet-poor plasma was isolated from citrated blood by double centrifugation at 2400g for 15 minutes at room temperature, aliquoted, and stored at -80°C until testing.

Neutrophil CD11b and Tissue Factor expression

After erythrocytes lysis, blood cells were incubated for 30 minutes in the dark with saturating concentrations of anti-CD11b (PE mouse anti-human CD11b, BD Pharmingen, ICRF44 clone), anti-tissue factor (PE mouse anti-human CD142, BD Pharmingen, HTF1 clone) or irrelevant isotype-identical negative control antibody (IgG2a-phycoerythrin; BD Biosciences, San Jose, CA). Flow cytometry analysis was performed using an Accuri C6 flow cytometer (BD Pharmingen) and data were interpreted using BD Accuri C6 Analysis Software.

DNA quantification

150µL of plasma was used to quantify DNA concentration using fluorescent probe and detection of fluorescence at 520nm after excitation at 480 nm following manufacturer instructions (Quant-It PicoGreen dsDNA assay kit, Thermofisher Scientific).

MPO-DNA complexes quantification

High affinity 96-wells plate was coated with an anti-MPO antibody (AbD Serotec, 4A4 clone) overnight at +4°c, before washing and saturation using DuoSet ELISA Ancillary Reagent kit (RD Systems). Then, 150 µL of plasma was added with blocking reagent during 2 hours at room temperature, following an anti-DNA antibody (Roche, MCA-33 clone) coupled to peroxydase during 2 hours following manufacturer's instructions (Cell Death Detection ELISA Plus, Sigma-Aldrich). Finally, tetramethylbenzidine (TMB) peroxydase substrate was added for 15 minutes before stopping reaction with sulfuric acid. Absorbance was measured at 405 nm. All samples were analyzed in duplicate.

NET quantification

Mononuclear cells were isolated by deposition of whole blood on a mixture of Dextran 9% and Radioselectan 38%, followed by 40 minutes sedimentation. The upper phase containing mononuclear cells and plasma was then added to a Percoll gradient (Percoll, Sigma-Aldrich, reference: P4937) to obtain neutrophils. Purity of the isolate, up to 90%, was confirmed by an automatic count at each experiment. Isolated neutrophils were allowed to adhere during 3 hours at 37°C. After fixation with paraformaldehyde (PFA) during 1 hour and saturation with PBS containing 5% of bovine serum albumin (BSA), NETs were stained with a primary mouse monoclonal anti-DNA-H1 antibody (Merck, reference: MAB3864) resolved with Alexa Fluor 588 conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, California). Cells were mounted in Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector

Laboratories, Burlingame, California), imaged with a fluorescent microscope (AxioObserver, Zeiss) and analyzed by ZEN imaging software (Zeiss). Number of neutrophils forming NET was quantified and a ratio between neutrophils forming NET and the total number of neutrophils was performed.

ROS quantification in neutrophils

Neutrophils were isolated using the same method as it was described for NET quantification. Neutrophils were resuspended in PBS containing calcium and magnesium (Gibco PBS, Thermofisher Scientific) in absence or presence of PMA at the concentration of 25 nM. CM-H2DCFDA probe (Thermofisher Scientific, reference: C6827) was added to the suspension at the concentration of 0,5µM during 15 minutes. Reaction was stopped using addition of 500 µL of PBS containing EDTA. Flow cytometry analysis was performed using an Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences) and data were interpreted using BD Accuri C6 Analysis Software.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was calculated using the Student t test or Mann-Whitney statistical test to compare differences between 2 groups. For multiple groups, we used 1-way-ANOVA followed by Tukey post-hoc test or 2-way-ANOVA followed by Sidak post-hoc test. GraphPad Prism 6 was used. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Patients characteristics

We included 53 patients with newly diagnosed MPN, and 26 controls. Their general characteristics are shown in Table 1. Among patients with MPN, 24 had a history of thrombosis, 20 venous and 4 arterial. All thrombosis had occurred at least 2 months before blood sampling. At the time of enrolment, 61% of ET patients and 50% of PV patients were receiving antiplatelet therapy but none of them was on a cytoreductive therapy. 25 ET patients (75,7%), 12 PV patients (100%) and 7 MF patients (87,5%) were positive for the JAK2V617F mutation.

Neutrophils of newly diagnosed MPN patients are spontaneously activated

Previous studies have reported increased neutrophil activation in MPN, using measurement of CD11b expression on neutrophil membrane[8,9,10,11]. Before analysing NET formation, we aimed to observe whether we reproduced this observation in our population of newly diagnosed MPN patients. Indeed, we observed an increased CD11b expression in MPN patients compared with controls (Fig 1A), and, as published in ET patients[12], no difference between MPN patients with or without a history of thrombosis (Fig 1B). Tissue Factor (TF) is reported to be present on the surface of activated neutrophils either produced by them or bound to NETs. Interestingly we observed increased membrane TF expression in patients (Fig 1C), but no significant difference between patients with and without a history of thrombosis (Fig 1D).

Unstimulated neutrophils of MPN patients are more prone to form NET

We then used microscopy to analyse whether neutrophils isolated from newly diagnosed MPN patients were more prone to form NET ex-vivo. Interestingly, we observed that unstimulated neutrophils from MPN patients were more prone to form NET than controls (Figure 2 A and B). Because the mechanism of NET formation is in part dependent on Reactive Oxygen Species

(ROS) generation, we investigated whether basal ROS production was increased in newly diagnosed MPN patients. The percentage of neutrophils with elevated ROS levels was higher in patients than controls (Figure 2C and D).

NET biomarkers are increased in the plasma of newly diagnosed MPN patients

Another way to quantify NET formation in patients is to measure plasma levels of NET biomarkers. Plasmatic free DNA was shown to be associated with NET formation in various conditions, including thrombosis[13,14,15]. We observed that DNA concentration was significantly higher in MPN patients than in controls (Figure 3A), but did not observe any difference according to the type of MPN (Figure 3B) or the JAK2V617F allelic burden (Figure 3C). Because plasmatic free DNA can be increased in other settings than NETosis such as apoptosis or necrosis, we then used a more specific marker of in vivo NET formation, ie quantification of DNA complexed with myeloperoxidase (MPO). We observed increased MPO-DNA concentrations in newly diagnosed MPN patients compared with controls (Figure 3D). Altogether, using in vitro and in vivo assays, we showed that neutrophils from newly diagnosed MPN patients are spontaneously activated and prone to NET formation.

Higher MPO-DNA complexes are found in MPN patients with a history of thrombosis

Given the role of NETs in the pathogenesis of thrombosis, we next aimed to assess whether increased NET formation is associated with higher propensity for thrombosis in MPN patients. Analysis of spontaneous NET formation by microscopy did not reveal any significant difference between MPN patients with or without a history of thrombosis (Figure 4A). Along with this result, the percentage of neutrophils with elevated ROS levels was not significantly different in both subgroups (Figure 4B). Analysis of levels of circulating DNA, a rather unspecific marker of in vivo NET formation, was also not significantly different between MPN patients with or

without a history of thrombosis (Figure 4C). Lastly, we observed that quantification of MPO-DNA complexes was higher in MPN patients with a history of thrombosis than in MPN patients without thrombosis (Figure 4D), in favour of the pathogenic role of NET formation in the occurrence of thrombosis.

Discussion

Thrombosis is the main cause of morbidity and mortality in MPN. Despite significant advances in the understanding of the mechanisms involved in thrombosis during these diseases, its physiopathology is not completely clear. These last years have put the light on leukocytes as potential new actors in thrombosis. When activated, neutrophils can form NETs that not only trap bacteria but also trigger platelet activation and activate the coagulation cascade. In pathological settings, NETs were shown to promote thrombosis and recent studies suggest that leukocytes are involved in the pathogenesis of thrombosis in the setting of MPN. Indeed i) leukocytosis is a biological risk factor for thrombosis in ET[16,17] and possibly in PV[18], ii) many studies reported increased neutrophil activation in MPN[19,20,10,21,22,11,23], iii) using a mouse model of JAK2V617F MPN, Wolach et al reported increased NETosis and direct involvement of this process on the occurrence of venous thrombosis[24]. Given the pathogenic role of MPN neutrophils in thrombosis, we thus reasoned that NETosis markers could be efficient biomarkers of thrombosis in MPN patients. To test this hypothesis we measured different biomarkers of leukocyte activation and correlated them with the occurrence of a previous thrombotic event. We only included MPN patients at the time of diagnosis, as we were concerned that cytoreductive drug would have an effect on leukocyte activation, which could induce a bias in our results.

As reported by previous studies, we confirm increased MPN neutrophil activation compared to controls, with increased CD11b and Tissue Factor expression. But, when we analyse separately MPN patients with and without a history of thrombosis, we could not demonstrate any difference between the two groups, suggesting that these markers cannot be used as biomarkers of thrombosis.

We observed increased spontaneous *ex vivo* NET formation compared with healthy controls, which is conflicting with the results from Oyarzun and co-authors[25] who studied 32 MPN patients and 32 controls. But their cohort included 53 % of patients with cytoreductive therapy, which could lower the rate of NET formation. Wolach et al also did not find any significant

difference in spontaneous ex vivo NET formation from 19 MPN patients compared with controls but all patients were receiving therapies, here again inducing a bias[26]. In our study, specific analysis of subgroups of MPN patients, according to history of thrombosis did not reveal any difference, suggesting that measurement of ex vivo NET formation was not a biomarker of thrombosis. This result is in agreement with the results of Oyarzun and co-authors who also did not find a difference of NET formation between patients with history of thrombosis and those with not[25].

We then analysed plasmatic biomarkers of NETosis, which have the advantage to be measurable on frozen plasma, contrary to ex vivo NET formation assays that require fresh blood samples, many hours of technical sampling and which is hardly standardisable. Measurement of plasmatic DNA has been extensively used as a NET biomarker in clinical studies[27,28,29] but it is a rather unspecific test for NETosis as it quantifies all sources of DNAs, whatever the cell type of origin is, and whatever the mechanism for DNA production is (necrosis, apoptosis, NETosis). We observed a difference between controls and patients but, here again, no difference according to the history of thrombosis. These results are in agreement with results from Oyarzun and co-authors who have demonstrated elevated levels of circulating nucleosomes in their cohort of MPN patients[25]. To more specifically measure NETs, i.e DNA that comes from neutrophils, it is necessary to combine a measurement of DNA (or histones or nucleosomes) with a measurement of an enzyme that is specific from neutrophil (commonly MPO or elastase). Tailor-made capture ELISA tests have thus been developed to measure MPO-DNA or histone-MPO complexes. Here, we observed that plasmatic MPO-DNA was significantly higher in MPN patients compared to controls but also higher in MPN patients with a history of thrombosis compared with MPN patients without a history of thrombosis. This interesting result is in accordance with the pathogenic role of neutrophils in MPN-related thrombosis described in mice[24] and suggests that MPO-DNA is a biomarker of MPN-related thrombosis. Oyarzun and coauthors did not measure MPO-DNA but Histone-MPO complexes in their cohort of MPN patients[25]. They did not find

any statistical difference concerning Histone-MPO complexes between patients and controls but, as stated earlier, the majority of their patients were under cytoreductive therapy, which can induce a bias in the results, as they suggest themselves in their study.

In this study, we describe for the first time a new biomarker associated with the occurrence of thrombosis in the setting of MPN. This raises two perspectives for the future. First, prospective studies are now needed to confirm the interest of this marker to predict the occurence of thrombosis during MPN. Second, it would be interesting to evaluate this marker as a biomarker of thrombosis apart from MPN, during thrombotic diseases in general.

Acknowledgments

The authors wish to thank Axelle Lascaux, Gabriel Etienne, Jean-François Viallard, Pierre Duffau for their help in patient's inclusion. We are grateful to William Vainchenker (Institut Gustave Roussy, Inserm U1009) and Jean-François Viallard (Inserm U1034) for helpful discussions. We are also grateful to the French Intergroup Myeloproliferative (FIM).

Sources of funding

This study was supported by research grants from INSERM, The Fondation Bettencourt Schueller, the Aquitaine Region. AG was supported by research grant from INSERM (Poste Accueil INSERM) and VGL by ANR-DFG JAKPOT.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest

References

1. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128–5133.
2. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.
3. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010;107(36):15880–15885.
4. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 2010;16(8):887–896.
5. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 2012;209(4):819–835.
6. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(436):eaan8292.
7. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937–951.
8. Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Reverter JC, et al. Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis. *Ann. Hematol.* 2008;87(4):269–276.
9. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter J-C, et al. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am. J. Hematol.* 2008;84(2):102–108.
10. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp. Hematol.* 2007;35(5):702–711.
11. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMH, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2008;112(10):4061–4068.
12. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, et al. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*. 2006;7.
13. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(8):1777–1783.
14. Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönermarck U, et al. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 2009;15(6):623–625.
15. Yalavarthi S, Gould TJ, Rao AN, et al. Release of Neutrophil Extracellular Traps by Neutrophils Stimulated With Antiphospholipid Antibodies: A Newly Identified Mechanism of Thrombosis in the Antiphospholipid Syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 2015;67(11):2990–3003.
16. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117(22):5857–5859.
17. Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Schalling M, et al. Impact of white blood cell counts at diagnosis and during follow-up in patients with essential thrombocythaemia and prefibrotic primary myelofibrosis. *Br. J. Haematol.* 2016;179(1):166–169.
18. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;109(6):2446–2452.
19. Falanga A, Marchetti M, Evangelista V, et al. Polymorphonuclear leukocyte activation

and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2000;96(13):7.
20. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2005;33(5):523–530.
21. Gupta N, Edelmann B, Schnoeder TM, et al. JAK2-V617F activates β1-integrin-mediated adhesion of granulocytes to vascular cell adhesion molecule 1. *Leukemia*. 2017;31(5):1223–1226.
22. Edelmann B, Gupta N, Schnöder TM, et al. JAK2-V617F promotes venous thrombosis through β1/β2 integrin activation. *J. Clin. Invest.* 2018;
23. Gangaraju R, Kim SJ, Song J, et al. Upregulation of Thrombo-Inflammatory Pathways May Contribute to Increased Thrombotic Risk in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. *Blood*. 2016;128(22):3143–3143.
24. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(436):eaan8292.
25. Oyarzún CP, Carestia A, Lev PR, et al. Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *Sci. Rep.* 2016;6(1):.
26. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(436):eaan8292.
27. Fuchs TA, Kremer Hovinga JA, Schatzberg D, Wagner DD, Lammle B. Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. *Blood*. 2012;120(6):1157–1164.
28. Borissoff JI, Joosen IA, Versteylen MO, et al. Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin Are Independently Associated With Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2013;33(8):2032–2040.
29. Jiménez-Alcázar M, Limacher A, Panda R, et al. Circulating extracellular DNA is an independent predictor of mortality in elderly patients with venous thromboembolism. *PLOS ONE*. 2018;13(2):e0191150.

Figure Legends

Table 1. Characteristics of patients with myeloproliferative neoplasms at the time of diagnosis. ET means essential thrombocythemia, PV polycythemia vera, MF myelofibrosis, CALR Calreticulin, VKA vitamin K antagonist, Values are reported as median and ranges.

Figure 1. Markers of neutrophils activation are increased in MPN patients. (A) CD11b expression is increased at the surface of neutrophils from MPN patients **(B)** without difference between patients with history of thrombosis and patients without history of thrombosis. **(C)** Tissue factor expression is increased at the surface of neutrophils from MPN patients **(D)** without difference between patients with history of thrombosis and patients without history of thrombosis. Statistical significance by Mann-Whitney test.*P < 0,05. **P< 0,01.

Figure 2. Neutrophils from MPN patients form more NET than controls and produce more ROS. **(A)** Neutrophils of patients form more NET than neutrophils of controls. **(B)** Representative images of NET formation in patients and in controls. Sclare bar: 100µM. ROS production is increased in neutrophils of MPN patients, regarding **(C)** % of positive cells and **(D)** probe mean fluorescence intensity. Statistical significance by student t-test. *P < 0.05, **P < 0.01, ****P< 0.0001.

Figure 3. NETosis markers are increased in MPN patients. (A) Increased plasmatic DNA concentration in MPN patients with no difference of DNA concentration according to **(B)** the type of MPN or **(C)** the allelic burden. **(D)** Increased plasmatic MPO-DNA concentration in MPN patients with no difference of MPO-DNA concentration according to **(E)** the type of MPN or **(F)** the allelic burden. Statistical significance by student t-test or one-way ANOVA and post hoc Dunn's test. *P < 0.05; **< 0,01, **** P < 0.0001.

Figure 4. Plasmatic MPO-DNA concentration is increased in MPN patients with history of thrombosis. **(A)** No difference of NET formation between MPN patients with history of thrombosis and patients without. **(B)** No difference of neutrophils ROS production between MPN patients with history of thrombosis and patients without. **(C)** No difference of plasmatic DNA concentration neutrophils ROS production between MPN patients with history of thrombosis and patients without. **(D)** Plasmatic MPO-DNA concentration is increased in MPN patients with history of thrombosis. Statistical significance by student t-test or Mann-Whitney test. *P< 0,05.

Table 1

	ET	PV	MF	Control
Number of patients	33	12	8	26
Age	53 (39-65)	49 (43-66)	59 (49-69)	26 (21-32)
Female, n (%)	23 (69,6)	8 (66,6)	5 (62.5)	19 (73)
Previous thrombosis, n (%)	14 (42)	5 (41,7)	5 (62.5)	-
Arterial thrombosis, n (%)	3 (21,4)	1 (20)	0 (0)	-
Venous thrombosis, n (%)	11 (78,6)	4 (80)	5 (100)	-
JAK2V617F, n (%)	25 (75,7)	12 (100)	7 (87.5)	-
Allelic burden (%)	18 (12-33)	54 (40-64)	40 (8-60)	-
CALR, n (%)	5 (15)	-	0	-
MPL, n (%)	1 (3)	-	0	-
Triple-negative, n(%)	0	-	1 (12.5)	-
Aspirine, n (%)	20 (61)	6 (50)	0	-
VKA, n (%)	4 (12,1)	3 (25)	2 (25)	-

Figure 1

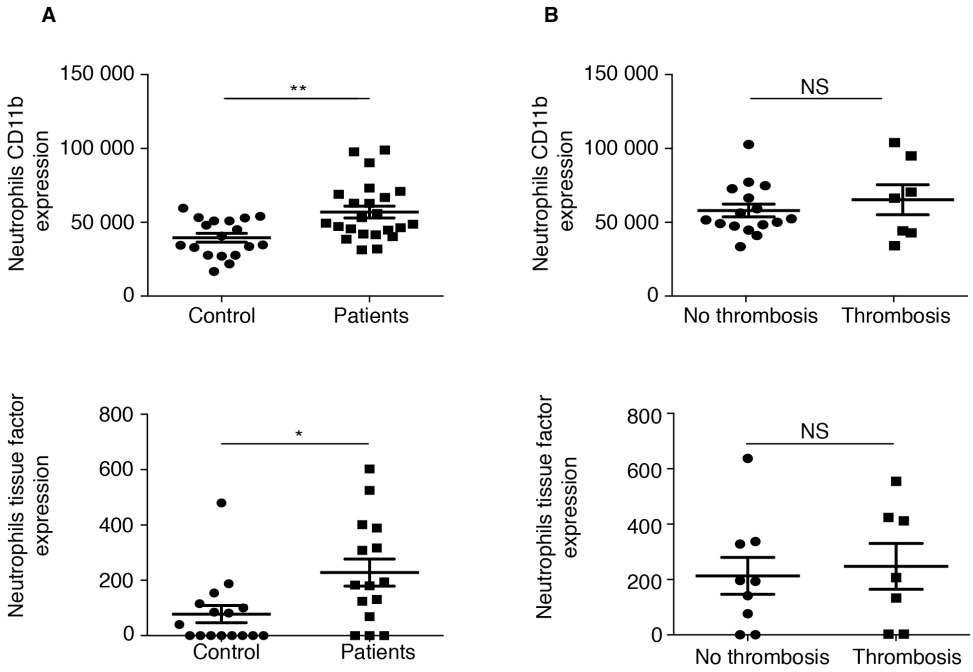

A
B
Neutrophils CD11b expression
150 000
100 000
50 000
0
**
NS
Control
Patients
No thrombosis
Thrombosis
Neutrophils tissue factor expression
800
600
400
200
0
*
NS
Control
Patients
No thrombosis
Thrombosis

Figure 2

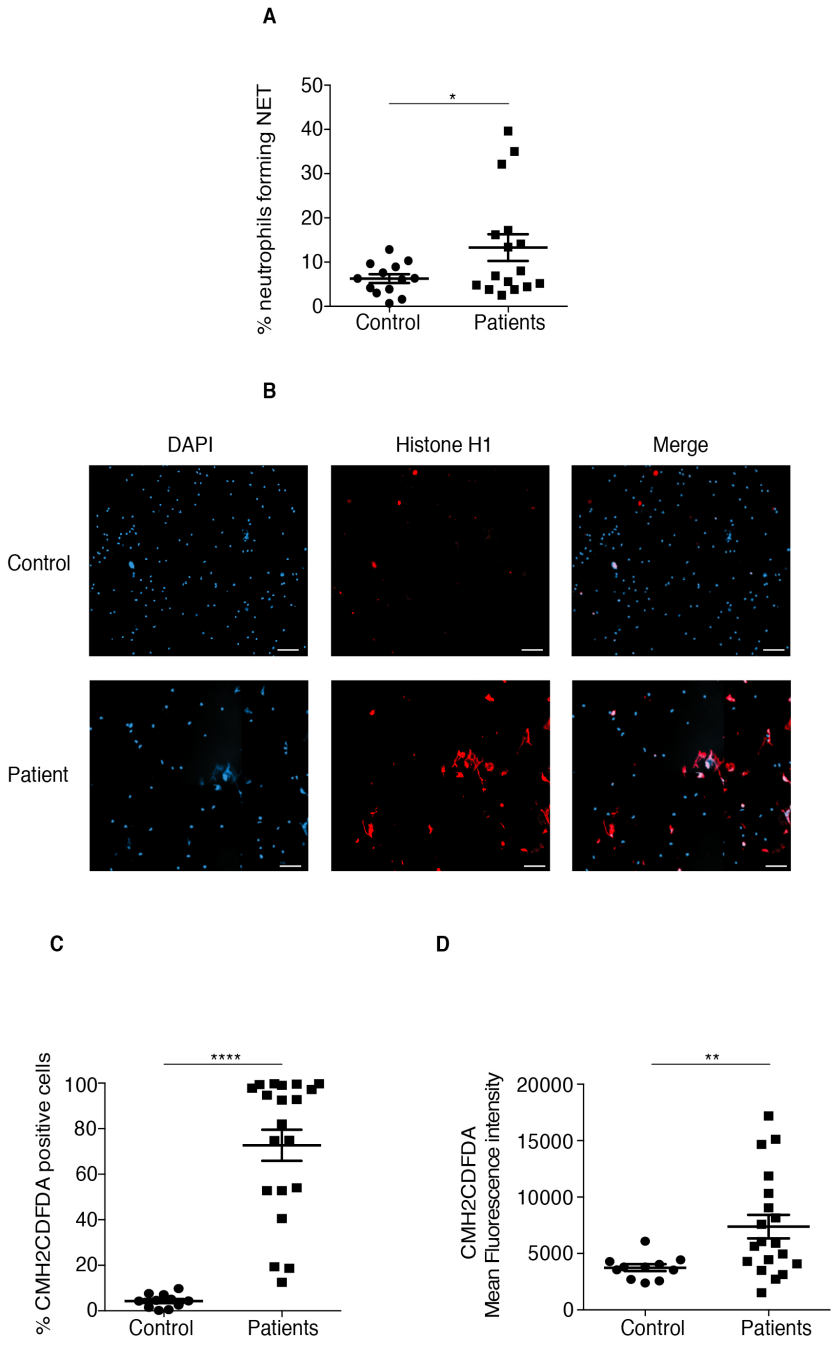

A
% neutrophils forming NET
50
40
30
20
10
0
*
Control
Patients
B
DAPI
Histone H1
Merge
Control
Patient
C
% CMH2CDFDA positive cells
100
80
60
40
20
0
****
Control
Patients
D
CMH2CDFDA
Mean Fluorescence intensity
20000
15000
10000
5000
0
**
Control
Patients

Figure 3

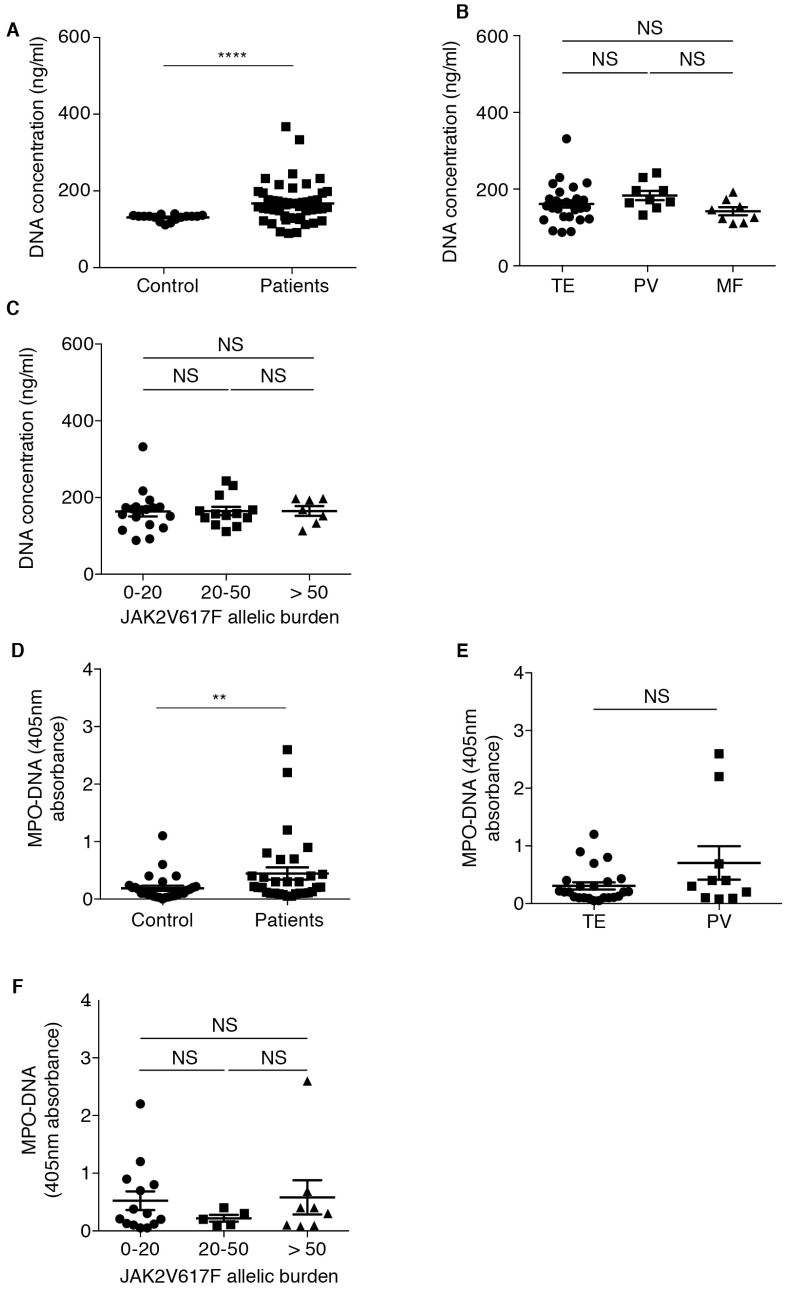
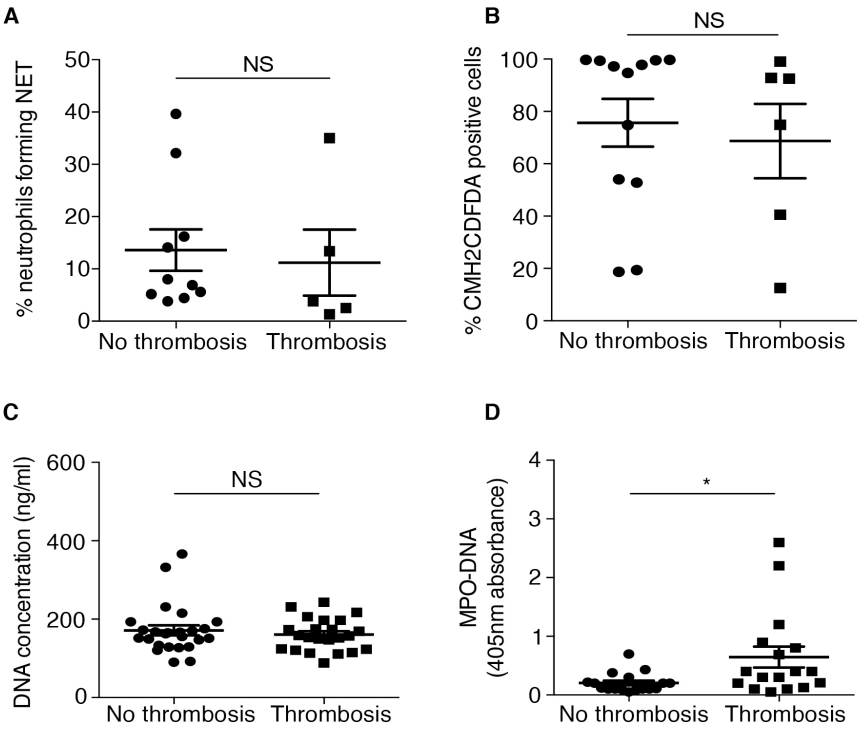

A
DNA concentration (ng/ml)
600
400
200
0
****
Control
Patients
B
DNA concentration (ng/ml)
NS
NS
NS
TE
PV
MF
C
DNA concentration (ng/ml)
NS
NS
NS
0-20
20-50
> 50
JAK2V617F allelic burden
D
MPO-DNA (405nm absorbance)
**
Control
Patients
E
MPO-DNA (405nm absorbance)
NS
TE
PV
F
MPO-DNA (405nm absorbance)
NS
NS
NS
0-20
20-50
> 50
JAK2V617F allelic burden

Figure 4


A
% neutrophils forming NET
50
40
30
20
10
0
NS
No thrombosis
Thrombosis
B
% CMH2CDFDA positive cells
100
80
60
40
20
0
NS
No thrombosis
Thrombosis
C
DNA concentration (ng/ml)
600
400
200
0
NS
No thrombosis
Thrombosis
D
MPO-DNA
(405nm absorbance)
4
3
2
1
0
*
No thrombosis
Thrombosis

<u>Article 3</u> : Les plaquettes et les polynucléaires neutrophiles collaborent pour induire une formation de neutrophil extracellular trap (NET) augmentée au cours des néoplasies myéloprolifératives avec mutation JAK2V617F

Article en préparation

Ayant mis en évidence une formation de neutrophil extracellular trap (NET) augmentée dans une cohorte de patients avec néoplasies myéloprolifératives (NMP), nous avions pour second objectif d'analyser la participation de cette formation de NET augmentée dans la physiopathologie de la thrombose et d'éclaircir les mécanismes en jeu dans la NETose accrue retrouvée chez les patients.

Nous avons ainsi utilisé deux modèles murins permettant la présence de la mutation JAK2V617F dans le compartiment hématopoiétique. Le premier, modèle *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$, permet la présence de la mutation JAK2V617F dans l'ensemble des cellules hématopoiétiques. Le second, modèle *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$, permet la présence de la mutation JAK2V617F dans la lignée granuleuse uniquement.

Dans ces deux modèles, nous avons constaté une augmentation de la formation de NET ex-vivo après activation des polynucléaires neutrophiles (PNN). Nous avons également mis en évidence une formation de thrombi augmentée dans le modèle *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$, avec diminution de cette formation de thrombi après administration d'un traitement par DNAse, démontrant la participation des NET dans la physiopathologie de la thrombose dans ce modèle murin. Cette augmentation de thrombose n'a pas été mise en évidence dans le modèle *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$, suggérant la nécessité de la participation d'autres acteurs que les PNN dans cette physiopathologie. Utilisant des expériences de formation de NET ex-vivo, nous avons pu mettre en évidence que les plaquettes avec mutation JAK2V617F induisaient une formation de NET augmentée à partir de PNN avec mutation JAK2V617F, ce qui n'était pas le cas en présence de la mutation uniquement dans les PNN ou dans les plaquettes. Au total, ces résultats confirment ce qui a été retrouvé chez les patients avec une formation de NET augmentée dans deux modèles murins différents. De plus, ces données démontrent la participation de la NETose dans la physiopathologie de la thrombose des NMP. Enfin, ces données montrent que les plaquettes avec mutation JAK2V617F déclenchent la formation de NET, suggérant une collaboration entre ces deux types cellulaires pour la formation de thrombi.

Neutrophils and platelets collaborate to induce an increase NET formation during JAK2V617F positive myeloproliferative neoplasms

Alexandre Guy[1] ; Virginie Gourdou-Latyszenok[1] ; Simon Favre[1] ; Badr Kilani[1] ; Caroline[2] Marty[2] ; Yacine Boulaftali[3] ; Matthieu Mosca[2] ; Thierry Couffinhal[1,4] ; Chloé James[1,5]

[1] Univ. Bordeaux, Inserm, UMR1034, Biology of Cardiovascular Diseases, F-33600 Pessac, France

[2] Univ. Paris XI, Inserm U1170, Gustave Roussy, Villejuif, France

[3] Univ. Paris Diderot, Inserm, UMR_S1148, LVTS, Paris, France

[4] CHU de Bordeaux, Service des Maladies Cardiaques et Vasculaires, F-33600 Pessac, France

[5] CHU de Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie, F-33600 Pessac, France

Address correspondence to: Chloe James, INSERM UMR 1034, CHU Haut-Lévêque, 1 avenue Magellan, 33600 Pessac. Phone: +33-5-57-89-19-79; E-mail: chloe.james@inserm.fr.

Key words: Thrombosis/ Myeloproliferative neoplasms/ Neutrophils/ NETosis

Abstract

Neutrophils are known to participate in the pathogenesis of thrombosis through neutrophil extracellular traps (NET) formation. Thrombosis is the main cause of morbidity and mortality in patients with myeloproliferative neoplasms. In these patients, neutrophils are activated and recent studies showed increased NET formation, leading to thrombosis in JAK2V617F mice. We aimed to investigate whether JAK2V617F neutrophils only are sufficient to promote thrombosis, or whether collaboration with other blood cells types is necessary. We studied two mouse models: the *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, with JAK2V617F in all hematopoietic lineages, thus mimicking the human disease, and *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice with JAK2V617F in neutrophils and monocytes only. In *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, we observed increased neutrophil extracellular trap formation and spontaneous lung thrombosis, that was abrogated by DNAse administration. On the contrary, in *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, we did not observe spontaneous lung thrombosis, despite increased neutrophil extracellular trap formation after stimulation with biochemical agent, suggesting the need of other actors in the physiopathology of thrombosis during MPN. Ex vivo experiments demonstrated that JAK2V617F mutated platelets trigger neutrophils extracellular formation in JAK2V617F mutated neutrophils, and that leukocytes-platelets aggregates are increased in the *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model, which is not true in the *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model. Altogether, our study demonstrates that JAK2V617F neutrophils alone are not sufficient to promote thrombosis and that the cooperation with platelets is important in NET formation.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms are acquired, clonal hematopoietic stem cells, characterized by an increased proliferation of myeloid progenitors in the bone marrow, and a subsequent increase in terminally differentiated blood cells. The Philadelphia chromosome-negative (Ph-) MPNs include polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF)[1]. For the majority of patients with MPN, the causing event is the occurrence, in a hematopoietic stem cell, of an activating mutation in the Janus kinase 2 (JAK2) gene, JAK2 V617F. This mutation is responsible for constitutive activation of intracellular signalling pathways downstream of various cytokine receptors. In most of the patients without JAK2V617F mutation, the causing mutations (Calreticulin or MPL mutation) are also responsible for an activation of the JAK pathway.

Thrombosis reveals MPN in about 30% of patients and is a major cause of morbidity and mortality. Understanding the mechanisms underlying the MPN thrombotic diathesis is crucial to develop anti thrombotic strategies. Platelets have been extensively studied both in patients and mouse models of MPN: in most of the patients, they seem to be activated[2,3,4], a result that lead to systematic treatment with antiplatelet treatment (such as aspirin). Nevertheless, studies in mice with JAK2V617F MPN led to conflicting conclusions depending on the mouse model that was used[5,6]. Results from large clinical studies identified increased leukocytosis as a risk factor for thrombosis in PV and ET, suggesting that neutrophils may be involved in the pathogenesis of thrombosis[7,8]. Indeed, these last ten years have revealed that neutrophils can dismantle and expel nuclear DNA, thus forming Neutrophil Extracellular Traps (NETs)[9]. These NETs not only trap bacteria but also promote activation of platelets, extrinsic and intrinsic pathways of coagulation and inhibit fibrinolysis, thus promoting thrombosis[10,11,12,13,14]. Very recently, increased NET formation was reported in MPN patients and in a JAK2V617F MPN mouse model, leading to increased thrombosis in mice[15]. Nevertheless, the mechanisms that are responsible for increased

NETosis remain unknown, leaving unanswered the question of which actor to target to decrease the thrombotic risk.

In this study we aimed to understand whether JAK2V617F neutrophils are intrinsically prone to NETosis and thrombosis, or whether they require other partners such as platelets. To answer this question, we used two mouse models: one mimicking patients' MPN with progressive development of JAK2V617F clonal hematopoiesis together with JAK2 wild type hematopoiesis, and another with a restriction of JAK2V617F expression in neutrophils.

Methods

Generation and characterization of *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$*, *PF4iCre;JAK2$^{V617F/W}$;mT/mG* and *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mice

Conditional heterozygous JAK2$^{V617F/WT}$ knock-in (JAK2^{V617F} KI) mice have been previously described[16]. *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mice were generated by crossing *JAK2$^{V617F/WT}$* KI mice with *PF4iCre* transgenic mice[17] allowing constitutive expression of JAK2^{V617F} under dependence of PF4 promoter. *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mice were crossed with *mT/mG* mice[18] to obtain *PF4iCre;JAK2$^{V617F/W}$;mT/mG* mice, in order to visualize efficacy of recombination with green-fluorescent protein (GFP) expression. *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mice were generated by crossing *JAK2$^{V617F/WT}$* KI mice with *MRP8iCre* transgenic mice[19] allowing constitutive expression of JAK2^{V617F} under dependence of MRP8 promoter. *PF4iCre-negative;JAK2$^{V617F/WT}$* and *MRP8iCre-negative;JAK2$^{V617F/WT}$* mice were used as controls. Adult mice were genotyped by PCR using the P1/P2 primer set for the wild-type allele and for the JAK2 Flex allele: P1: 5'-GTCTGTCCAAAGAGTCTGTAAGTAC- 3' ; P2 : 5'-GCTCCAGGGTTACACGAGTC- 3'. For PF4 Cre-recombinase, forward primer: 5'-CTCTGACAGATGCCAGGACA-3', and reverse primer: 5'-TCTCTGCCCAGTCATCCT-3' were used. Haematocrit, hemoglobin level, platelet, and white cells count were determined using an automated counter (Scil Vet abc Plus+) on blood collected from the sublingual vein in EDTA containing tubes.

DNA purification and quantitative allele-specific PCR in neutrophils of *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* and *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mice

Mice were anesthetized, and blood was collected via the retro-orbital venous plexus in polypropylene Eppendorf tubes containing EDTA. Within 2 hours after collection, blood was processed for neutrophils isolation. We used EasySep Mouse Neutrophil Enrichment Kit (StemCell), following manufacturer's instructions. Genomic DNAs were purified from isolated neutrophils using NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, 740952). For dosage of wild type

(WT) and mutated JAK2 DNA, quantitative allele specific PCR from gDNA was conducted using the GAAGCAGCAAGCATGATGAG forward primer and the AAAGACAAGCAGCTGGCTTTACTTAC reversed primer for PCR amplification and the GTGTCTGTTTCTGTGGA JAK2V617F probe or the GTGTCTGTGTCTGTGGA JAK2WT probe to identify amplified fragments from the mutated or WT JAK2 DNA, respectively. It was performed on a 7500 Real Time PCR System AB (Applied Biosystems, Foster City, USA) and analysed with associated software.

Flow cytometry

After erythrocytes lysis, blood or bone marrow cells were incubated with Fc blocker (BD Pharmingen, 24G2 clone) before being stained with anti-Ter-119 (APC Rat anti-mouse Ter119, BD Pharmingen, Ter-119 clone), anti-CD42 (APC anti-mouse CD42d, BioLegend, 1C2 clone) or anti-Ly6G antibody (APC rat anti-mouse Ly6G, BD Pharmingen, 1A8 clone). Flow cytometry analysis was performed using an Accuri C6 flow cytometer (BD Pharmingen). Data were interpreted using BD Accuri C6 Analysis Software.

Mouse neutrophil isolation and NET quantification

Neutrophils were isolated as described earlier and then plated at 50 000 cells per 24-well plates in triplicate. They were then stimulated or not with 50 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich) for 15 hours at 37°C. After fixation with 2% paraformaldehide (PFA), samples were blocked with 5% of bovine serum albumin (BSA), and rinsed. NET were stained with a rabbit polyclonal anti-Histone H3 antibody (abcam, reference: ab1791) resolved with Alexa Fluor 588 conjugated secondary antibody (Invitrogen, Carlsbad, California). Cells were mounted in Vectashield mounting medium containing 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, Burlingame, California), imaged with a fluorescent microscope (AxioObserver, Zeiss) and analyzed by ZEN imaging software (Zeiss). Quantification of NET

was based on morphological criteria that included nuclear delobulation and swelling and/or extension of web-like DNA strands among neutrophils positive for H1 staining. Results are expressed as percent NETs of DAPI-positive neutrophils. NET quantification was assessed independently by two investigators blinded to the conditions (AG and SF).

Plasma free DNA quantification

To perform mice DNA quantification, mice were anesthetized, and blood was obtained by retro-orbital venous plexus sampling in polypropylene Eppendorf tubes containing citrate. Plasma was prepared after two centrifugations at 2400 g for 10 min at room temperature. DNA level was measured using fluorescent probe and detection of fluorescence at 520nm after excitation at 480 nm (Quant-It PicoGreen dsDNA, Fisher Scientific), according to the manufacturer's instructions. 50µL of plasma was used, in duplicate.

Analysis of spontaneous thrombus formation

10 to 12 week-old *PF4iCre;JAK2V617F*$^{V617F/WT}$ and *PF4iCreERT2-negative;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice were used for all experiments. After euthanasia, an incision was performed in the thoracic wall to expose heart and lungs. To wash lung vessels and avoid fresh blood clotting, PBS without CaCl2 and MgCl2 (Gibco ThermoFisher Scientific) was perfused after intra-cardiac injection during 3 minutes. Then, 10% neutral-buffered formalin was perfused for another 3 minutes to fix the tissues in vivo. Lungs were then removed and preserved in formalin for at least 24 hours before paraffin embedding.

Histology

To quantify thrombus formation in mice, we used Carstairs staining. This technique allows visualization of platelets, red blood cells and fibrin{von Bruhl, 2012 #10}. Slides were hydrated in xylol and ethanol to distilled water, followed by incubation in 5% ferric ammonium sulfate for

5 min, washing, and staining by Mayer hematoxylin for 5 min and Picric Acid-orange G solution for 1 hour. After washing, slides were stained by 1% phosphotungstic acid for 10 min, Ponceau Fuchsin solution for 7 min, washing, and 1% phosphotungstic acid for 10 minutes. After washing, slides were stained with Anilin blue solution for 30 min, and rinsed in distilled water. Slides were dehydrated and covered with a coverslip using mounting medium. Presence of thrombi was assessed by fibrin deposition in the lumen of a vessel. Thrombus quantification was performed using an optical microscope and pulmonary area was measured to calculate the ratio thrombi number/pulmonary area (number of thrombi/cm^2). Three slides per mouse were analyzed by two independent observers, blindly. Sections were visualized using a Nikon Microphot-FXA microscope (10 x objective), and images were captured with a Axiocam HR digital Camera (Zeiss, Germany), and analyzed using ZEN imaging software (Zeiss).

Systemic Collagen/Epinephrine-Induced Thrombosis and DNase treatment

DNase 1 (Pulmozyme, Genentech) was diluted in sterile saline and injected intravenously. Control mice were injected with the DNase vehicle buffer [sodium chloride (8.77 mg/ml) and calcium chloride (0.15 mg/ml)] diluted in sterile saline. Three hours after DNase treatment, 75µg/kg collagen (Nycomed Pharma, 7806141/450) and 30µg/kg epinephrine (Helena Laboratories, 5367) were injected intraperitoneally and 3 minutes after, mice were euthanized.

NETs formation assays in the presence of platelets

Neutrophils were isolated as described earlier. For platelets isolation, blood was collected via the retro-orbital venous plexus in polypropylene Eppendorf tubes containing ACDA. Platelets-rich-plasma was collected after centrifugation at 200 g for 6 minutes at room temperature. PRP was then pelleted at 700 g in the presence of prostaglandin I2 (PGI2) (2µg/mL). Pellets were washed using thyrode-Hepes buffer [134 mM NaCl, 0.34 mM Na2HPO4, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO3, 5 mM Hepes, 1 mM MgCl2, 5 mM glucose, and 0.35% BSA (pH 7.4)] containing

PGI2. Washed platelets (150 µl with 5×10^5 platelets/µl), in Tyrode-Hepes buffer containing 2 mM CaCl2, were stimulated or not using 50 µM thrombin-receptor activated peptide (TRAP). Platelets were then incubated with neutrophils for 30 minutes at 37°C. After PFA fixation and saturation with 5% BSA PBS, NET were stained and quantified as described earlier.

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. Statistical significance was calculated using the Student t test or Mann-Whitney statistical test to compare differences between 2 groups. For multiple groups, we used 1-way-ANOVA followed by Tukey post-hoc test or 2-way-ANOVA followed by Sidak post-hoc test. GraphPad Prism 6 was used. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

Results

The *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model resembles human *JAK2*V617F MPN

To study the involvement of JAK2V617F neutrophils in thrombosis, we developed a new conditional JAK2-driven MPN mouse model, using conditional heterozygous JAK2$^{V617F/WT}$ [16] mice crossed with *PF4iCre* transgenic mice[17]. As PF4-Cre was shown to be active in a fraction of hematopoietic stem cells[20] we reasoned that *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice could be a relevant model of MPN, with clonal JAK2V617F hematopoiesis coexisting with JAK2 wild type polyclonal hematopoiesis, and progressive development of myeloproliferation. Given that PF4-Cre is expressed in the majority of megakaryocytes[20,17], we were not surprised to observe a thrombocytosis in 4-week-old *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice (Fig. 1A). During the first 2 months, the thrombocytosis stayed isolated thus mimicking ET. But at the age of 10 weeks, hematocrit and neutrophils counts were elevated, resembling PV, and this phenotype remained after 16 weeks of observation. Examination of the spleen in 12-week-old mice revealed splenomegaly (Fig. 1B).

To precisely measure the size of the JAK2V617F clone and the efficiency of Cre-recombination in hematopoietic lineages, we crossed *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice with reporter *mT/mG* mice[18]. In control mouse blood, flow cytometry analysis revealed green-fluorescent protein (GFP) expression in 99% of platelets as expected, but also in a minority (<10%) of red blood cells and neutrophils (Fig. 1C) consistent with an expression of PF4 in a fraction of HSC[20] (Fig. 1C). In the MKs, erythroblasts and myeloid precursors, close results were obtained to those found in the respective mature blood cells but with a slight decrease in the frequency of GFP$^+$ cells. In *PF4iCre;mT/mG;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, almost all platelets and red blood cells were GFP$^+$ and around 50% of neutrophils. As expected, almost all MKs of the bone marrow were GFP$^+$, but only a minority of erythroblasts (≈ 13%) and myeloid precursors (≈ 8%) were positive. This is consistent with the fact that JAK2^{V617F} induces a marked proliferative advantage during late differentiation (Fig. 1C and D). We also performed *JAK2*V617F/ total JAK2 quantification in

neutrophils isolated from *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ and confirmed expression of *JAK2*V617F mutation in neutrophils (data not shown). Altogether, these data indicate that the *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model mimics the human MPN, with presence of small numbers of JAK2V617F HSC together with a majority of JAK2 wild-type HSC, bone marrow proliferation of all hematopoietic lineages, responsible for the development of an ET- rapidly followed by a PV-like phenotype after 10 weeks of age.

MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$ **mouse model allow specific expression of _JAK2_V617F in neutrophils**

To understand whether the increased NET formation that has been described in MPN is due to the presence of JAK2V617F in neutrophils only, we crossed mice carrying a flexed allele of *JAK2*V617F[16] with a granulocyte lineage-specific MRP8-*Cre-Ires*/GFP transgenic mouse mice[19] (Fig. 2A). Blood cell parameters stayed comparable between *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and controls (Fig. 2B). To analyze recombination efficiency, we measured GFP expression in hematopoietic lineages as *MRP8iCre* mice allow GFP expression in Cre-expressing cells. No GFP positive cell was observed among red blood cells and platelets, but more than 75% of neutrophils were GFP positive in *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ and control mice (Fig. 2C). *JAK2*V617F/ total JAK2 quantification was performed in neutrophils isolated from *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ and confirmed expression of *JAK2*V617F mutation in neutrophils (data not shown).

Neutrophils from _MRP8iCre;JAK2_$^{V617F/WT}$ **and _PF4iCre;JAK2_**$^{V617F/WT}$ **mice are more prone to form NET when stimulated with PMA**

We first analyzed NET formation in neutrophils isolated from *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, a mouse model mimicking MPN disease in patients, and we found an increased NET formation after PMA stimulation, while spontaneous NET formation was similar between control and

PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$ mice (Fig. 3A and C). In accordance with this increased NET formation, we observed an increased plasmatic concentration of dsDNA in from *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice versus control mice (Fig. 3D). We then analyzed NET formation in neutrophils isolated from *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and observed that NET formation was also increased in neutrophils from *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice after PMA stimulation, but not spontaneously (Fig. 3B). However, plasmatic dsDNA concentration was not different between control mice and *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice (Fig. 3D), suggesting that in vivo, JAK2V617F neutrophils do not spontaneously form NETs if they are not stimulated by an extrinsic factor. Altogether, these results support the notion of increased NET formation during MPN, but only after extrinsic stimulation of JAK2V617F neutrophils.

Thrombosis formation is increased in *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice

To investigate whether *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice display a higher propensity for thrombosis, we examined spontaneous pulmonary thrombus formation using Carstairs staining to quantify thrombi. This staining allows viewing of platelets, red blood cells, and fibrin[13]. Increased thrombus formation was observed in the lungs of *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice compared to control mice (Fig. 4A and B). We then analyzed lung thrombus formation in *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice and did not find spontaneous thrombus formation (Fig. 4A). To determinate whether NET formation participates in the increased thrombus formation observed in *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, we next performed thrombus formation experiments after administration of type I DNAse in a collagen/epinephrine model of induced thrombosis. We observed that DNAse pre-treatment was protective against thrombosis occurrence (Fig. 4C). These results suggest that NETs participate in the physiopathology of thrombosis during MPN. However, the presence of JAK2V617F in neutrophils only, as in *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice, is not sufficient to promote thrombosis.

JAK2V617F platelets enhance NET formation during MPN

Given that platelets are known to cooperate with neutrophils to induce NET[21], we hypothesized that JAK2V617F platelets could be the extrinsic factor that would stimulate JAK2V617F neutrophils for NETosis. We thus analyzed NET formation in control or JAK2V617F mutated neutrophils (isolated from *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice) in presence of control or JAK2V617F mutated platelets (isolated from *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice). We first performed this experiment with non-activated platelets. We observed that control or JAK2V617F platelets have no effect on control neutrophils in term of NET formation (Fig. 5B). On the contrary, JAK2V617F neutrophils form more NETs when they are incubated with JAK2V617F platelets but not with control platelets (Fig. 5A). We observed similar results when we preactivated the platelets with thrombin-receptor activated peptide (Fig 5B).

These results demonstrate that V617F mutated platelets enhance NET formation from V617F mutated neutrophils, and that presence of the mutation in neutrophils only is not sufficient to induce a spontaneous NET formation.

Discussion

The main complication of MPN is thrombosis, and in up to 30% of patients, thrombosis is the first manifestation of the disease, leading to its diagnosis. Besides, venous thromboses in usual sites, such as splanchnic thrombosis or cerebral venous thrombosis are associated with MPN, without any understanding why. Deciphering the physiopathology of thrombosis in these diseases is thus a challenge, as it would allow better therapeutic targeting, and potential development of biomarkers associated with or predictive for thrombosis. Recently Wolach et al. highlighted the role of neutrophils extracellular traps in MPN-related thrombosis. They first used a model of venous thrombosis in a mouse model of JAK2V617F MPN. Nevertheless, they used *VavCre/Jak2*^{V617F} mice, which carry the JAK2V617F mutation both in blood and endothelial cells. They also performed experiments of stenosis of the inferior vena cava, in a model of transplantation of blood marrow from *VavCre/Jak2*^{V617F} mice in wild-type mice, but with potential bias secondary to mice irradiation[15]. Given that JAK2V617F endothelial cells by themselves promote thrombosis[22], we aimed to assess the role of NET formation in thrombosis in a mouse model of MPN restricted to blood cells, as is most often the case in patients. There are multiple mouse models restricted to the hematopoietic lineages described in the literature. Mx-Cre or Scl-Cre are inducible after interferon (IFN) injections, with the inconvenient that IFN may have its proper effect on bone marrow cells. Some groups use bone marrow transplantation to restrict JAK2V617F expression in bone marrow and blood cells, with the inconvenient that irradiation can modify the homeostasis of mice, especially in the endothelium. As PF4 is expressed in a fraction of normal HSC[20], we chose to cross *PF4iCre* transgenic mice with *JAK2*$^{V617F/WT}$ KI mice reasoning that we would reproduce the disease found in patients. Indeed, we observed that *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model allows the occurring of MPN in mice, as it can be observed in patients, with an earlier thrombocytosis, followed by an increase in hematocrit and leukocyte counts. This model thus allows the presence of the JAK2V617F

mutation in all hematopoietic lineages, without need of tamoxifen or interferon injection, neither bone marrow transplantation.

PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$ mouse model has advantages described upper but do not allows to analyse the specific consequences of the presence of JAK2V617F in neutrophils only. So, we next chose to study the *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model, allowing a neutrophil-specific recombination and the presence of the JAK2V61F mutation in neutrophils, without presence in other hematopoietic cells. By comparing these two mouse models, our study allowed us to progress on understanding the mechanisms involved in the increase NET formation during MPN.

We also show that the propensity of JAK2V617F mutated neutrophils is not sufficient to induce thrombosis, with a need of stimulation by platelets to provoke it. Indeed, our study show that lung thrombosis is increased in, model mimicking the disease found in patients, but not in the *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mouse model allowing the presence the JAK2V617F mutation in neutrophils only. Ex vivo experiments confirm that JAK2V617F platelets and neutrophils have synergistic effects to induce an increased NET formation.

Thrombus formation implicate monocytes and neutrophils in collaboration with coagulation factors and endothelial cells. Neutrophils possess cell-specific mechanisms to potentiate thrombosis. When activated, neutrophils can form neutrophil extracellular traps, i.e decondensed DNA associated with histones and granular enzymes (neutrophil elastase, myeloperoxydase, cathepsin G)[9,11]. NET can participate in the physiopathology of thrombosis via several mechanisms: inhibition of anticoagulant proteins as tissue factor pathway inhibitor (TFPI) or thrombomodulin (TM)[14], recruitment and activation of platelets[10], activation of the intrinsic pathway of coagulation via activation of factor XII[13], activation of the extrinsic pathway of coagulation via binding of tissue factor (TF), activation of endothelial cells[23,24]. Peptidyl arginine deiminase 4 (PAD4) is a crucial enzyme for NETosis. During NETosis, there is a translocation of PAD4 to the nucleus, leading to a citrullination of histones and a decondensation of chromatin, first step of NETosis. PAD4 can be activated by an increased in ROS production, and

via calcium impulses[25]. Neutrophil elastase (NE) and myeloperoxydase (MPO) also participate in the chromatin decondensation[26,27]. The release of NET can be separated between NETosis leading to death of neutrophils (named late suicidal NETosis) and NETosis occurring during a process of phagocytosis and chemotaxis (named early vital NETosis). Late suicidal NETosis, triggered by PMA or antibodies, is characterized by involvement of neutrophils ROS production and PAD4 nuclear translocation. In contrary, early vital NETosis, principally triggered by platelets or pathogens as *E. Coli* or *S. Aureus*, does not necessarily imply ROS production[28].

In our study, we demonstrate that JAK2V617F mutated platelets can trigger NET formation during MPN. Previous studies have shown that platelets were activated in patients with MPN: increase of P-Selectin and tissue factor expression, leukocytes-platelets aggregates, plasmatic markers of platelets activation (CD40-ligand, thromboxane A2)[2,4,3,29]. In mice, results from previous studies are more controversial. Lamrani and al. have showed a hypo-reactivity of platelets in a VavCre;JAK2^{V617F} mouse model[6]. These results were recently confirmed by Wolach and co-authors[15]. On contrary, Hobbs and co-authors have showed a platelet activation in a MxlCre;JAK2^{V617F} mouse model, mimicking essential thrombocytemia found in patients[5]. Etheridge and co-authors have studied two mouse models: the PF4-Cre/FF1 mouse model and the Tie2-Cre mouse model, the last allowing recombination in hematopoietic and endothelial cells. In their study, they did not find difference concerning platelet aggregation or integrin expression between control, PF4Cre/FF1 and TieCre/FF1 mice[30]. Differences of platelets functions found in these previous studies can be attributed to the different mouse models studied, with different kinetics in hematopoietic cells proliferation, and variation of recombination between the different lineages. Our *PF4Cre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model develop a thrombocytosis in 8 weeks, following by an increase in hematocrit and leukocytes levels, thus it may be a model more similar to the MxlCre model than to the VavCre model.

Previous studies have shown that platelets trigger the formation of NET. Clark and co-authors have demonstrated that LPS activated platelets can trigger NET formation, participating in

bacteria trapping[21]. Interestingly, it has been recently shown that neutrophils stimulation by platelets was under the dependence of P-Selectin and PSGL1 link[31]. Our results confirm that platelets are a major player of NET formation, especially in the context of MPN disease during which platelets and neutrophils are activated.

Our study has potential therapeutic implications. Indeed, we demonstrate that neutrophils and platelets collaborate to induce an increase NET formation during MPN. These results confirm the need of inhibit platelet activation during MPN, especially with aspirin treatment. Interestingly, these datas indicate that aspirin prescription (or other platelet function inhibitor) can be a useful inhibitor of neutrophil activation and NET formation. Target neutrophils and NET formation during MPN can be another alternative, maybe via inhibiting JAK/STAT pathway, with ruxolitinib for example.

Acknowledgments

The authors wish to thank Myriam Petit and Annabel Reynaud, Beatrice Jaspard-Vinassa for their assistance in histology, Jeremie Teillon for his help in image quantification, Sylvain Grolleau for his help in mice genotyping, Jerome Guignard for his help with mice. We are grateful to William Vainchenker (Institut Gustave Roussy, Inserm U1009), Jean-François Viallard (Inserm U1034) and Martine Jandrot-Perrus (Inserm UMR_S1148, LVTS) for helpful discussions. We are also grateful to the French Intergroup Myeloproliferative (FIM).

Sources of funding

This study was supported by research grants from INSERM, The Fondation Bettencourt Schueller, the Aquitaine Region. AG was supported by research grant from INSERM (Poste Accueil INSERM) and VGL by ANR-DFG JAKPOT.

Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no competing financial interest

References

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391–2405.
2. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Barbui T. Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Exp. Hematol.* 2005;33(5):523–530.
3. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, et al. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp. Hematol.* 2007;35(5):702–711.
4. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, et al. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. *Haematologica*. 2006;7.
5. Hobbs CM, Manning H, Bennett C, et al. JAK2V617F leads to intrinsic changes in platelet formation and reactivity in a knock-in mouse model of essential thrombocythemia. *Blood*. 2013;122(23):3787–3797.
6. Lamrani L, Lacout C, Ollivier V, et al. Hemostatic disorders in a JAK2V617F-driven mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2014;124(7):1136–1145.
7. Campbell PJ, MacLean C, Beer PA, et al. Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. *Blood*. 2012;120(7):1409–1411.
8. Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, et al. Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood*. 2011;117(22):5857–5859.
9. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, et al. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–1535.
10. Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010;107(36):15880–15885.
11. Fuchs TA, Brill A, Wagner DD. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32(8):1777–1783.
12. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice: NETs promote deep vein thrombosis. *J. Thromb. Haemost.* 2012;10(1):136–144.
13. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 2012;209(4):819–835.
14. Massberg S, Grahl L, von Bruehl M-L, et al. Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 2010;16(8):887–896.
15. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* 2018;10(436):eaan8292.
16. Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN. *Blood*. 2013;122(8):1464–1477.
17. Tiedt R, Schomber T, Hao-Shen H, Skoda RC. Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. *Blood*. 2007;109(4):1503–1506.
18. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *genesis*. 2007;45(9):593–605.
19. Passegué E, Wagner EF, Weissman IL. JunB Deficiency Leads to a Myeloproliferative

Disorder Arising from Hematopoietic Stem Cells. *Cell*. 2004;119(3):431–443.
20. Calaminus SDJ, Guitart A, Sinclair A, et al. Lineage Tracing of Pf4-Cre Marks Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. *PLoS ONE*. 2012;7(12):e51361.
21. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 2007;13(4):463–469.
22. Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le-Lay N, et al. Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. *Haematologica*. 2018;haematol.2018.195321.
23. Yang X, Li L, Liu J, Lv B, Chen F. Extracellular histones induce tissue factor expression in vascular endothelial cells via TLR and activation of NF-κB and AP-1. *Thromb. Res.* 2016;137:211–218.
24. Michels A, Swystun LL, Albanez S, et al. Histones Induce Endothelial Von Willebrand Factor Release and Subsequent Platelet Capture in In Vitro and In Vivo Models | Blood Journal. 2014;
25. Wang S, Wang Y. Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 2013;1829(10):1126–1135.
26. Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 2010;191(3):677–691.
27. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011;117(3):953–959.
28. Engelmann B, Massberg S. Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2013;13(1):34–45.
29. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter J-C, et al. Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. *Am. J. Hematol.* 2008;84(2):102–108.
30. Etheridge SL, Roh ME, Cosgrove ME, et al. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111(6):2295–2300.
31. Etulain J, Martinod K, Wong SL, et al. P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*. 2015;126(2):242–246.

Figure Legends

Figure 1. *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model is a reliable model of MPN disease. (A) Occurrence of proliferation of platelets, red blood cells, leukocytes and neutrophils in *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model. **(B)** Occurence of splenomegaly in *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse. Statistical significance by Student t-test. **(C)** Presence of recombination in platelets, red blood cells and neutrophils of *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$;mT/mG* mouse model. Statistical significance by Mann-Whitney test. N = 5 mice per group. **(D)** Presence of recombination in megakaryocytes, erythroblasts, and granular progenitors of *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$;mT/mG* mouse model. Statistical significance by Mann-Whitney test. N = 5 mice per group. *P < 0.05; **P < 0.01.

Figure 2. *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model allow neutrophil specific presence of JAK2V617F mutation. (A) We crossed *MRP8Cre+/-* mice with *JAK2V617F$^{Flex/WT}$* mice to obtain *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model. **(B)** Absence of neutrophils, platelets, red blood cells proliferation in *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* model. **(C)** Occurrence of recombination visualized by GFP expression in more than 70% of neutrophils in *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model, without recombination in platelets or red blood cells. Statistical significance by Mann-Whitney test. N = 5 mice per group.

Figure 3. There is an increased NET formation in *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* and *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mouse model. (A) NET formation is increased in *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* and **(B)** *MRP8iCre;JAK2$^{V617F/WT}$* mice than in control in presence of PMA. **(C)** Representative images of NET formation in presence of PMA in control and *PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$ mice.* Scale bar: 100µM. **(D)** Plasmatic DNA concentration is increased in

PF4iCre;JAK2$^{V617F/WT}$ mice than in control and *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice . Statistical significance by Mann-Whitney test and one-way ANOVA and post-hoc Dunn test . *P < 0.05; **P < 0.01.

Figure 4. There is an increased thrombus formation in *PF4iCre;JAK*$^{V617F/WT}$ but not in *MRP8iCre;JAK*$^{V617F/WT}$ mouse model. (A) Spontaneous lung thrombus formation is increased in *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice than in control, but not in *MRP8iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. **(B)** Representative images of lung thrombus using Carstairs staining in control mice and *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. Scale bar: 500µM. **(C)** Lung thrombus formation is reduced after DNAse treatment in *PF4iCre;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice. Statistical significance by Mann-Whitney test. *P < 0.05.

Figure 5. JAK2V617F platelets and neutrophils are necessary to induce increased NET formation. There is increased NET formation in presence of JAK2V617F platelets and JAK2V617F neutrophils, without activation **(A)** or after platelet activation **(B)** with thrombin-receptor activated peptide (TRAP) during 30 minutes at the concentration of 50µM. Statistical significance by one-way ANOVA analysis of variance and Dunn post-hoc test. *P < 0.05; **P < 0.01.***P < 0.001.

Figure 1

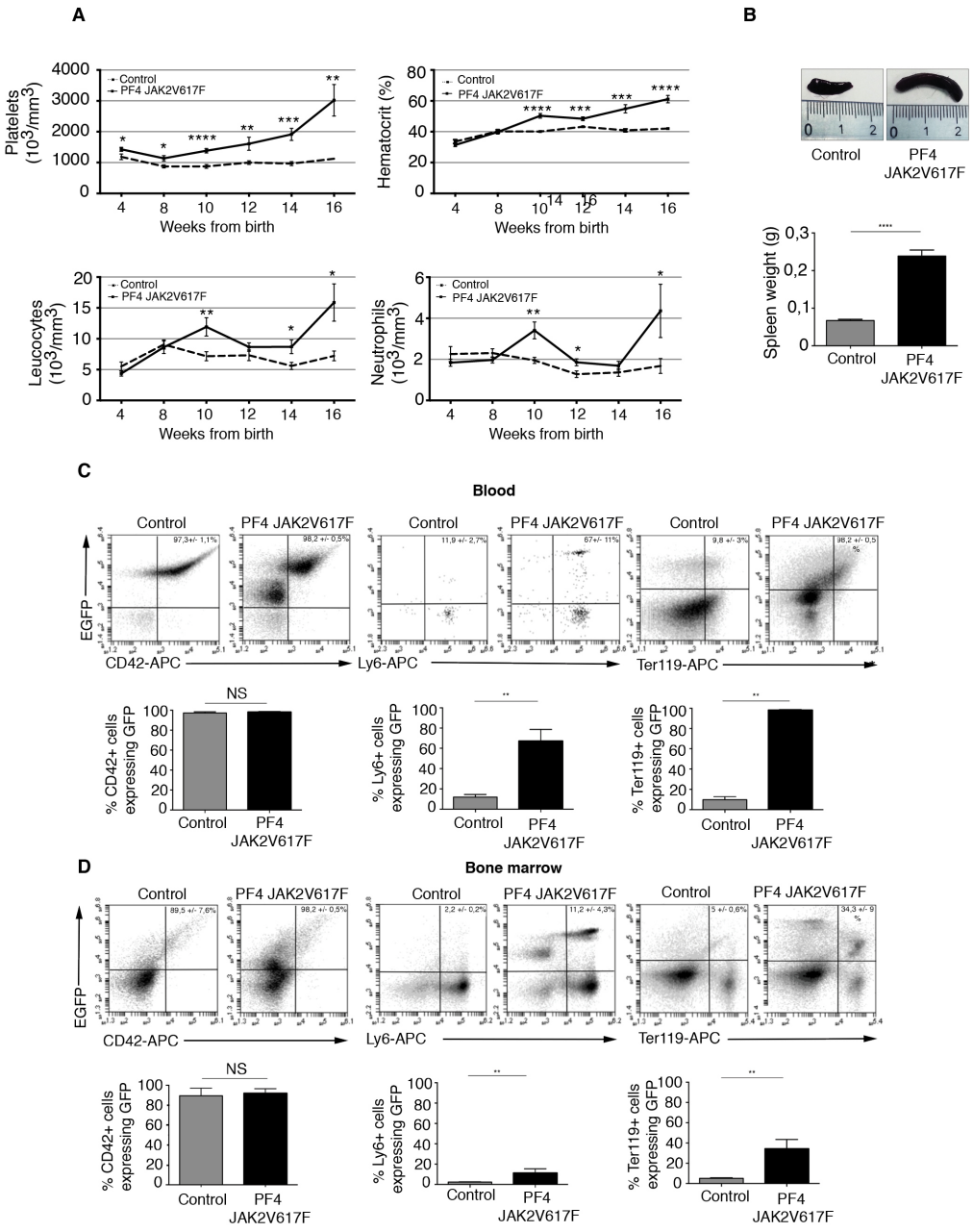

A
B
C
D
Control
PF4 JAK2V617F
Platelets (10^3/mm^3)
Hematocrit (%)
Leucocytes (10^3/mm^3)
Neutrophils (10^3/mm^3)
Weeks from birth
Spleen weight (g)
Blood
Bone marrow
EGFP
CD42-APC
Ly6-APC
Ter119-APC
% CD42+ cells expressing GFP
% Ly6+ cells expressing GFP
% Ter119+ cells expressing GFP
NS

Figure 2

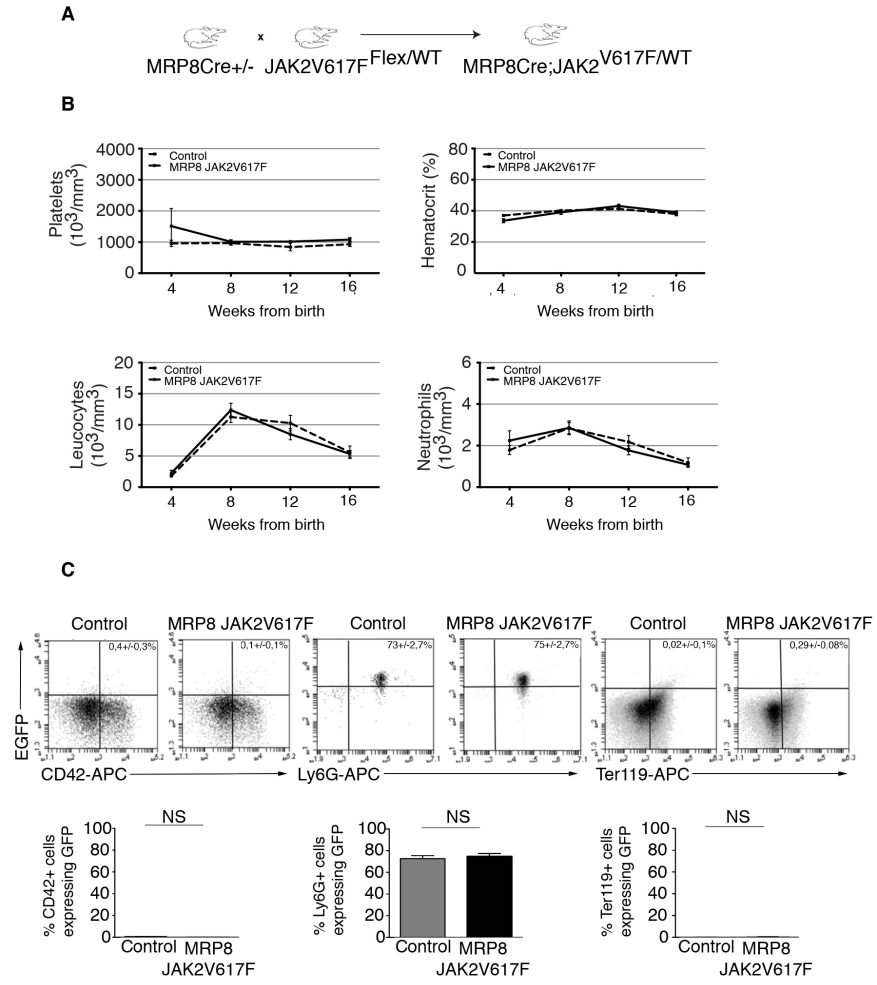

A
MRP8Cre+/- JAK2V617F Flex/WT
MRP8Cre;JAK2 V617F/WT
B
Platelets (10^3/mm^3)
Hematocrit (%)
Leucocytes (10^3/mm^3)
Neutrophils (10^3/mm^3)
Control
MRP8 JAK2V617F
Weeks from birth
C
Control
MRP8 JAK2V617F
0,4+/-0,3%
0,1+/-0,1%
73+/-2,7%
75+/-2,7%
0,02+/-0,1%
0,29+/-0.08%
EGFP
CD42-APC
Ly6G-APC
Ter119-APC
% CD42+ cells expressing GFP
% Ly6G+ cells expressing GFP
% Ter119+ cells expressing GFP
NS
Control
MRP8 JAK2V617F

Figure 3

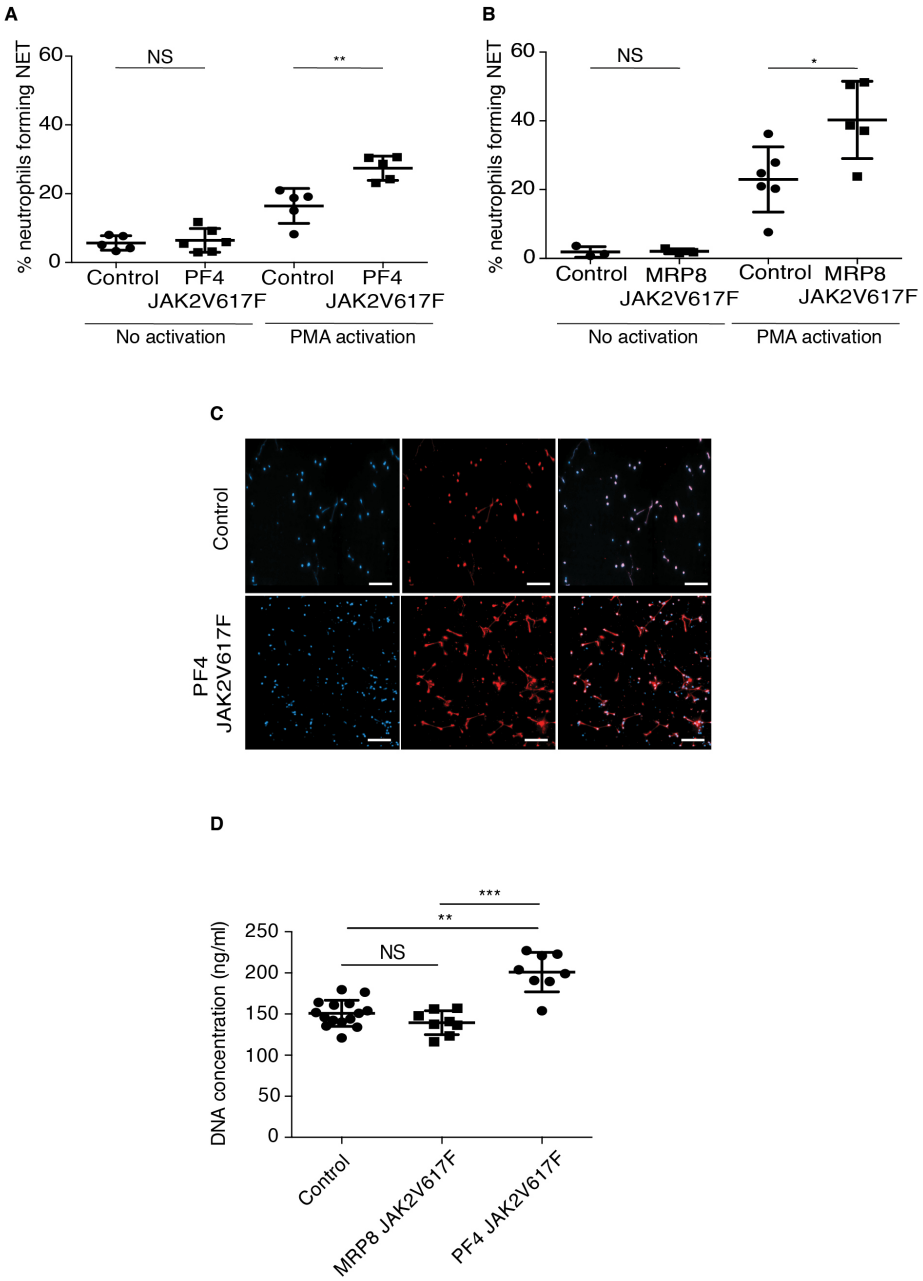

A
% neutrophils forming NET
60
40
20
0
NS
**
Control
PF4 JAK2V617F
Control
PF4 JAK2V617F
No activation
PMA activation
B
% neutrophils forming NET
60
40
20
0
NS
*
Control
MRP8 JAK2V617F
Control
MRP8 JAK2V617F
No activation
PMA activation
C
Control
PF4 JAK2V617F
D
DNA concentration (ng/ml)
250
200
150
100
50
0
***
**
NS
Control
MRP8 JAK2V617F
PF4 JAK2V617F

Figure 4

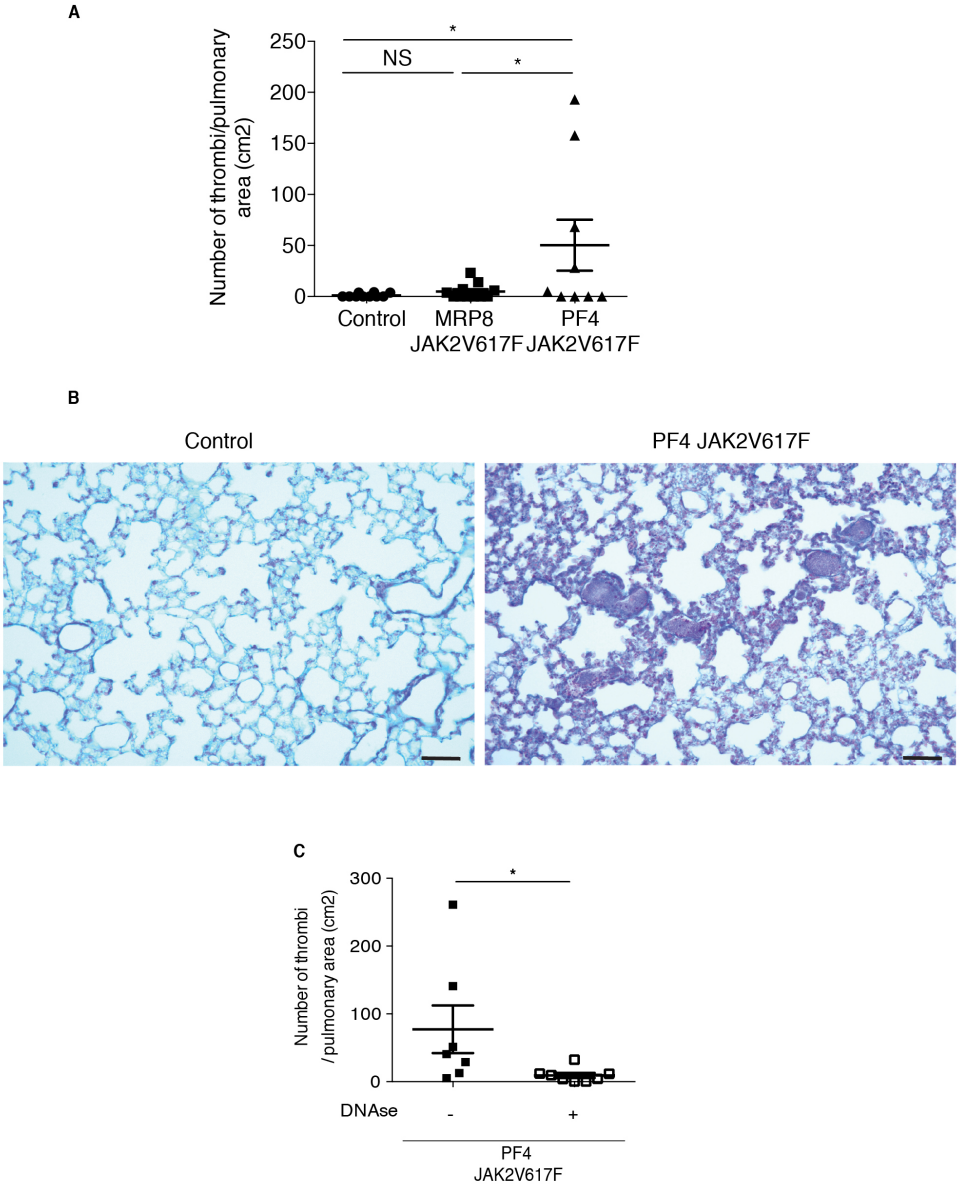
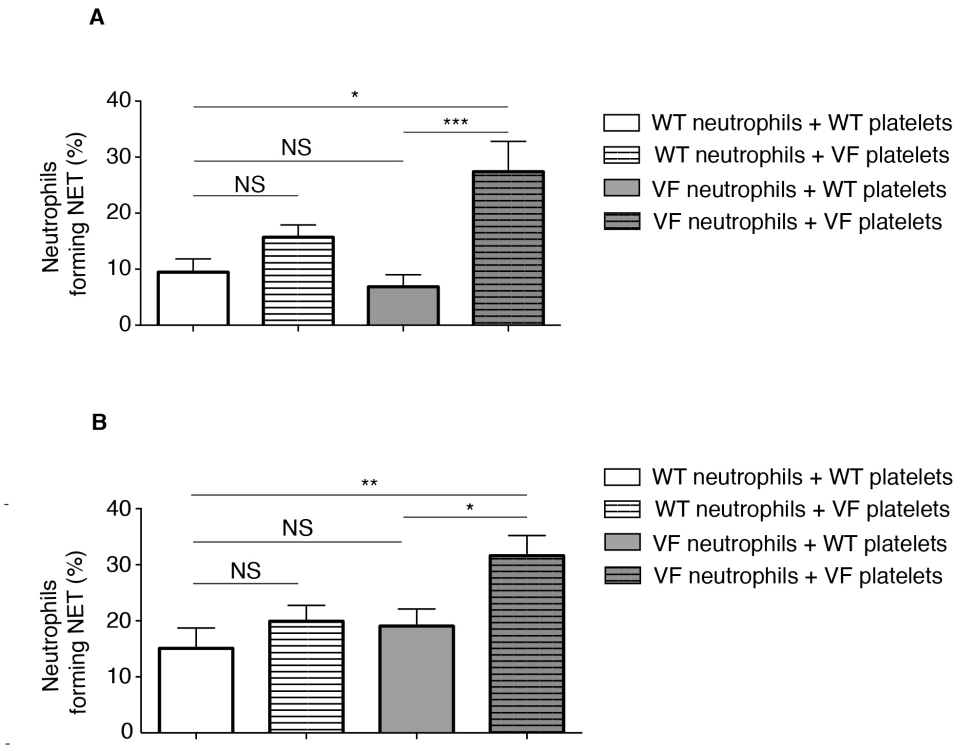

A
Number of thrombi/pulmonary area (cm2)
250
200
150
100
50
0
NS
*
*
Control
MRP8 JAK2V617F
PF4 JAK2V617F
B
Control
PF4 JAK2V617F
C
Number of thrombi /pulmonary area (cm2)
300
200
100
0
*
DNAse
-
+
PF4 JAK2V617F

Figure 5


A
Neutrophils forming NET (%)
40
30
20
10
0
*
***
NS
NS
WT neutrophils + WT platelets
WT neutrophils + VF platelets
VF neutrophils + WT platelets
VF neutrophils + VF platelets
B
Neutrophils forming NET (%)
40
30
20
10
0
**
*
NS
NS
WT neutrophils + WT platelets
WT neutrophils + VF platelets
VF neutrophils + WT platelets
VF neutrophils + VF platelets

Discussion et perspectives

1ère partie : Etude du rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myélo-prolifératives avec mutation JAK2V617F

I. Principaux résultats obtenus

Dans cette première partie, nous avons premièrement montré que la survenue de thrombose au niveau pulmonaire était augmentée chez les souris *PDGFb-iCre;JAK2$^{V617F/WT,}$* exprimant la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales uniquement.

L'étape suivante a été de caractériser les cellules endothéliales JAK2V617F, dans ce modèle murin, mais également à l'aide d'expériences réalisées *in vitro*, à l'aide d'HUVEC possédant la mutation JAK2V617F (réalisation d'une transduction avec un lentivirus JAK2V617F). Nous avons ainsi constaté que les HUVEC JAK2V617F ne possédaient pas de propriétés pro-coagulantes, sans différence en termes de génération de thrombine, d'activation de la protéine C, ou de modifications du métabolisme oxydatif. Par contre, nous avons constaté *in vitro* et *in vivo* que les CE JAK2V617F entraînaient une augmentation de l'adhésion des cellules mononuclées et des neutrophiles.

La question suivante a été de déterminer les protéines responsables d'une telle modification de phénotype et nous avons ainsi pu montrer que les taux de P-Selectine et de facteur Willebrand étaient augmentés à la surface des HUVEC JAK2V617F, mais également chez les souris *PDGFb-iCre;JAK2$^{V617F/WT}$*. Connaissant le rôle crucial de la P-Sélectine dans la physiopathologie de la thrombose en dehors des NMP, nous avons focalisé notre attention sur cette protéine et ainsi montré que son inhibition menait à une diminution de l'adhésion et du rolling des leucocytes, mais également permettait de prévenir la survenue de thrombose dans le modèle murin *PDGFb-iCre;JAK2$^{V617F/WT}$*.

Enfin, l'hydroyurée ayant montré un effet direct anti-adhesif sur les CE et étant un médicament couramment utilisé en pratique clinique au cours des NMP, nous avons voulu savoir si ce traitement pouvait jouer un rôle au niveau des CE JAK2V617F. Et, en effet, nous avons constaté que l'administration d'HU prévenait la survenue de thrombose, inhibait l'adhésion et le

rolling des leucocytes sur les CE JAK2V617F, mais jouait également un rôle direct sur les CE en diminuant l'adhésion des neutrophiles dans des expériences réalisées in vitro.

Ces résultats soulèvent cependant plusieurs questions que j'aborderai dans les paragraphes suivants.

II. Limites, questions soulevées et perspectives futures

A. Comment la mutation JAK2V617F peut-t-elle survenir dans une cellule endothéliale ?

Au cours des néoplasies myélo-prolifératives avec mutation JAK2V617F, la mutation JAK2V617F survient dans un contingent de cellules souches hématopoiétiques, conférant à celles-ci un avantage prolifératif et de survie et expliquant la prolifération sanguine retrouvée.

Nous pouvons formuler **quatre hypothèses principales** (non antinomiques) pour expliquer la survenue de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial **(Figure 23)**:

1/ **la mutation JAK2V617F survient dans une cellule très immature** capable de se différencier en cellules hématopoiétiques et en cellules endothéliales (hypothèse d'un hémangioblaste).

2/ **la mutation JAK2V617F survient dans une cellule endothéliale** qui est capable de donner naissance à des cellules souches hématopoiétiques (hypothèse de l'endothélium hémogénique).

3/ **la mutation JAK2V617F est acquise par des cellules endothéliales matures** via la migration puis la transdifférenciation de cellules d'origine hématopoiétique au niveau du vaisseau (hypothèse de l'intégration de cellules hématopoiétiques et/ou d'une différenciation hémato-endothéliale)

4/ **la mutation JAK2V617F est acquise par les cellules endothéliales** via un transfert génique.

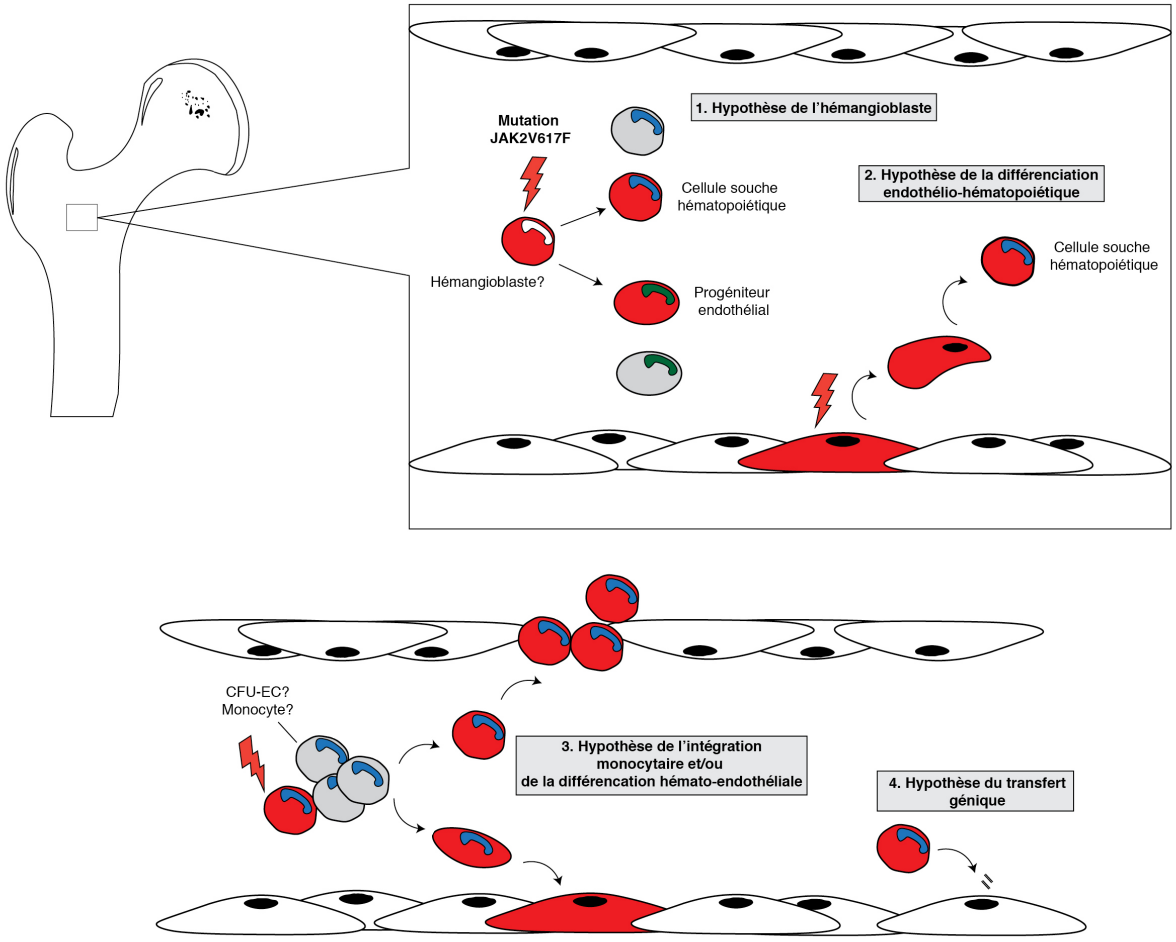


Figure 23 : Hypothèses de survenue de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial
Au niveau médullaire, il existe des arguments pour l'existence d'un hémangioblaste, cellule donnant naissance à une cellule souche hématopoiétique et un progéniteur endothélial. La mutation JAK2V617F pourrait survenir dans cette cellule (Hypothèse 1). La mutation JAK2V617F pourrait également survenir dans une cellule endothéliale, ce qui favoriserait sa différenciation en cellule souche hématopoiétique (Hypothèse 2). Au niveau périphérique, une cellule d'origine hématopoiétique pourrait intégrer la paroi vasculaire voire effectuer une différenciation en cellule endothéliale (Hypothèse 3). Moins probable, on pourrait imaginer un transfert de la mutaiton JAK2V617F entre une cellule hématooiétique et une cellule endothéliale (Hypothèse 4).

En plus d'expliquer la présence de la mutation JAK2V617F au sein du compartiment endothélial, les hypothèses ainsi formulées nous ont permis d'approfondir et d'élargir les travaux de l'équipe aux questions suivantes :

- Existe-t-il une transition endothélio-hématopoiétique au cours des NMP JAK2V617F ?
- A l'inverse, les cellules hématopoiétiques sont-elles capables d'intégrer puis de se différencier en cellules endothéliales matures ?

a. L'hypothèse d'un hémangioblaste

1) La recherche d'un progéniteur commun aux lignées hématopoiétique et endothéliale ou hémangioblaste

Le fait que les cellules immatures hématopoiétiques et endothéliales partagent des marqueurs communs (CD34, CD133, VEGF-R2 (ou KDR)) suggère que ces deux types cellulaires pourraient avoir un progéniteur commun. Une des voies pour identifier ce progéniteur commun a été de chercher à déterminer l'origine des progeniteurs endothéliaux circulants **(Asahara et al., 1997)**. Des arguments plaident pour une origine médullaire de ces cellules. En 1999, Asahara et ses co-auteurs ont effectué des expériences de transplantation médullaire en utilisant comme souris donneuses des souris exprimant la ß-galactosidase sous la dépendance de promoteurs endothéliaux (FlK1 et Tie2), afin de « tracer » dans les souris receveuses les cellules endothéliales progénitrices. A l'aide de modèles d'angiogenèse post-natale (ischémie de patte, ischémie myocardique, angiogenèse tumorale), ils ont ainsi montré que les cellules endothéliales progénitrices présentes dans les sites d'angiogenèse exprimaient la ß-galactosidase, plaidant en faveur d'une origine médullaire de ces progéniteurs endothéliaux circulants **(Asahara et al., 1999)**. En 2002, Grant et son équipe ont étudié des souris receveuses de cellules souches hématopoiétiques (cellules lin-sca+c-Kit+ ou LSK) exprimant la GFP (*green fluorescent protein*). Dans ces souris receveuses, un modèle de néovascularisation rétinienne (injection de VEGF et traitement par laser) a été développé, permettant la mise en évidence de cellules endothéliales GFP positive dans les vaisseaux nouvellement formés. Cette étude apportait des arguments pour une participation de progéniteurs endothéliaux d'origine médullaire dans la néovascularisation **(Grant et al., 2002)**.

En 2004, l'équipe menée par William Fleming a également utilisé un modèle de greffe osseuse à partir de moelle totale ou de cellules LSK exprimant la GFP. Les auteurs ont montré que des cellules endothéliales de souris receveuses exprimaient la GFP, au niveau de différents territoires vasculaires : veine portale, veine centrale de la rétine, vaisseaux sinusoïdes et artérioles hépatiques. Démontrant que la greffe d'une seule cellule LSK GFP-positif donnait lieu à la présence de cellules endothéliales GFP-positif chez la souris receveuse 6 mois après la transplantation, les auteurs apportaient de nouveaux arguments pour la clonalité d'un progéniteur commun aux deux lignées, hématopoiétique et endothéliale, situé dans le compartiment des cellules LSK **(Bailey et al., 2004)**. Cette étude ne permet cependant pas d'exclure la possibilité que des monocytes et/ou CFU-EC puissent s'intégrer au niveau de la paroi vasculaire.

Chez l'homme, en 2000, Lin et son équipe ont étudié des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse à partir de donneurs non apparentés sur le sexe, afin de pouvoir déterminer l'origine des progéniteurs endothéliaux circulants via l'étude des chromosomes sexuels en hybridation in situ en fluorescence (FISH) chez les patients receveurs. Dans cette étude, les auteurs montrent que la majorité des progeniteurs endothéliaux circulants (PEC) des patients receveurs avaient le génotype du donneur, plaidant en faveur d'une origine médullaire de ces PEC **(Lin et al., 2000)**. En 2004, l'équipe de Fleming a également étudié les cellules endothéliales situées au niveau cutané et intestinal de patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse de donneurs non apparentés sur le sexe. Les auteurs montraient, également par technique de FISH, que des cellules endothéliales de patients receveurs provenaient du donneur **(Jiang et al., 2004)**. Une autre équipe a apporté en 2002 des arguments pour l'existence d'un hémangioblaste existant en post-natal chez l'homme. Cette équipe a étudié des cellules co-exprimant les marqueurs CD34 et KDR, issues de sangs de cordon et de moelle osseuse. Les auteurs ont montré que la mise en culture de cellules CD34+KDR+ entraînait la formation de colonies hémato-endothéliales, ce qui n'était pas le cas de cellules CD34+KDR-. Utilisant des expériences de dilutions limites, les auteurs ont démontré la clonalité des cellules CD34+KDR. Enfin, les auteurs montraient que des cellules « filles » de colonies primaires (hématopoiétique, endothéliale, ou hémato-endothéliale) pouvaient générer (après « passage ») des colonies de différenciation autre que les cellules « mère », constituant un argument pour la présence d'un programme de différenciation double de ces cellules CD34+KDR+, flexible et modulable selon les conditions de culture. En conclusion, les auteurs de cette étude plaidaient pour l'existence d'un hémangioblaste en post-natal, cellule porteuse des antigènes CD34 et KDR **(Pelosi et al., 2002)**. On peut cependant apporter un « bémol » à cette étude, réalisée avant la mise en évidence de différents types de progéniteurs endothéliaux, avec la possibilité éventuelle que l' « hémangioblaste » mis en évidence soit en fait un progéniteur endothélial précoce, ou CFU-EC.

2) La recherche d'un hémangioblaste à l'aide du modèle des hémopathies malignes

Un des moyens réalisables pour la recherche d'un progéniteur commun aux lignées hématopoiétique et endothéliale est d'étudier des maladies de la lignée hématopoiétique caractérisées par un marqueur de clonalité, et de rechercher ce marqueur au niveau des cellules endothéliales. Ainsi, en 2000, Gunsilius et son équipe ont étudié six patients avec leucémie myéloïde chronique (LMC) porteurs d'un transcrit de fusion BCR-ABL. Après obtention de progéniteurs endothéliaux circulants à partir de cellules mononuclées de sang périphérique ou de moelle osseuse, les auteurs ont montré qu'une proportion de cellules endothéliales (allant de 0 à

56%) de patients exprimaient le transcrit BCR-ABL, constituant un argument pour l'existence d'un hémangioblaste porteur de cette anomalie moléculaire. De plus, chez un patient avec LMC, le transcrit de fusion était retrouvé au niveau de l'endothélium vasculaire myocardique, témoignant de la présence de cellules endothéliales avec transcrit de fusion BCR-ABL *in vivo* **(Gunsilius et al., 2000)**. Dans cette étude, les auteurs arguaient donc de l'existence d'un progéniteur commun aux deux lignées, hématopoiétique et endothéliale, au cours de la LMC. Il est difficile cependant d'émettre des conclusions définitives sur le type de cellules endothéliales analysées. Même si les auteurs rapportent l'analyse de cellules endothéliales différenciées, on peut se poser la question de savoir si ces cellules ne sont pas des CFU-EC, donc dérivées de cellules hématopoiétiques, ce qui irait contre l'existence d'un tel hémangioblaste. De même, ces résultats ne permettent cependant pas d'exclure l'hypothèse d'un endothélium hémogénique ou de l'acquisition d'un marqueur de clonalité par des cellules endothéliales matures. A noter tout de même que les auteurs rapportent une culture de cellules endothéliales maintenue pendant 12 semaines d'affilée, ce qui ne semble difficilement réalisable avec des CFU-EC, qui ne peuvent former des colonies après repiquage, comme l'a montré Yoder en 2007 **(Yoder et al., 2007)**. A noter que la recherche du transcrit de fusion BCR-ABL au niveau de CE fut confirmée en 2009 par une autre équipe **(Wu et al., 2009)**. Enfin, en 2005, une équipe étudia la possibilité de l'existence d'un hémangioblaste au cours de la leucémie myéloïde chronique utilisant un modèle murin NOD/SCID. Dans cette étude, les auteurs isolèrent des cellules Flk1+ (*fetal liver kinase 1 positive*) CD31-CD34- à partir de moelle osseuse de patients avec LMC BCR-ABL et montré que ces cellules pouvaient *in vitro* se différencier en cellules hématopoiétiques ou en cellules endothéliales matures porteuses du transcrit BCR-ABL. *In vivo*, les auteurs montraient également que les cellules Flk1+ porteuses du transcrit de fusion BCR-ABL pouvaient être greffées dans des souris NOD/SCID et participer à l'établissement d'un modèle murin de LMC. Enfin, et de manière intéressante, les auteurs retrouvaient chez les souris greffées des cellules endothéliales intestinales porteuses du transcrit de fusion, témoignant d'une participation de ces cellules dans des phénomènes de néoangiogénèse **(Fang et al., 2005)**.

En dehors de la LMC, la recherche d'un marqueur de clonalité commun aux cellules endothéliales et hématopoiétiques a également été effectuée au cours du myélome multiple. Ainsi, Rigolin et ses co-auteurs ont analysé les cellules endothéliales circulantes (CEC) de 8 patients atteints de myélome multiple avec délétion 13q14 et montré que chez 5 patients, les CEC étaient porteuses de la même anomalie chromosomique, en faveur d'un clone commun aux deux lignées **(Rigolin et al., 2006)**. Enfin, Streubel et ses co-auteurs ont également recherché des

marqueurs de clonalité communs aux lignées hématopoiétique et endothéliale, cette fois chez des patients atteints de lymphomes B. Dans leur étude, les auteurs ont isolé puis mis en culture les cellules endothéliales microvasculaires issues de la tumeur, et montré que 15 à 85% des cellules endothéliales isolées étaient porteuses des mêmes aberrations chromosomiques que les cellules lymphomateuses **(Streubel et al., 2004)**.

Toutes ces études apportent des arguments en faveur de la possibilité de l'existence d'un hémangioblaste au cours des hémopathies malignes. Cependant, on peut s'interroger sur plusieurs aspects. Premièrement, comme dit plus haut, la mise en évidence d'un marqueur de clonalité commun aux deux lignées ne démontre pas l'existence d'un hémangioblaste : le marqueur de clonalité peut être acquis via d'autres mécanismes. D'autant plus que dans un certain nombre de ces études, les auteurs ont étudié des cellules endothéliales matures, et non des progéniteurs endothéliaux. Deuxièmement, même si les auteurs de ces études ont généralement correctement validé la pureté des cellules endothéliales isolées puis analysées, il est difficile de ne pas penser à une éventuelle contamination par des cellules hématopoiétiques pouvant biaiser le résultat obtenu.

Au cours des NMP avec mutation JAK2V617F, seules les équipes de Yoder **(Yoder et al., 2007)** (pour 1 patient), de Teofili **(Teofili et al., 2011)** (pour 5 patients) et de Helman **(Helman et al., 2016)** (pour 4 patients) ont réussi à mettre en évidence la présence de la mutation JAK2V617F au niveau des progéniteurs endothéliaux (ECFC) de patients. A l'inverse, d'autres équipes ne retrouvaient pas de tels résultats **(Piaggio et al., 2009)(Rosti et al., 2013)**. Dans l'objectif d'étayer l'hypothèse d'un hémangioblaste au cours des NMP JAK2V617F, l'équipe de Sozer et de ses co-auteurs a étudié la capacité des cellules CD34+ de patients avec NMP de participer au compartiment endothélial dans des modèles de souris immuno-déficientes NOD-SCID. Dans cette étude, les auteurs montraient qu'après transplantation de cellules CD34+ JAK2V617F positif, des cellules endothéliales murines hépatiques et pulmonaires étaient porteuses de la mutation JAK2V617F, en faveur selon les auteurs d'un hémangioblaste positif pour le CD34. A noter que l'hypothèse d'une différenciation hémato-endothéliale ou d'une intégration de cellules hématopoiétiques au sein de la monocouche endothéliale n'était pas étudiée, ni donc exclue dans cette étude **(Sozer et al., 2009b)**. En effet, il reste possible qu'une intégration de cellules monocytaires et/ou de CFU-EC JAK2V617F positif s'effectue dans la paroi vasculaire.

Au cours de ma thèse, j'ai analysé les ECFC de patients avec NMP JAK2V617F. Nous avons inclus 134 patients et obtenu au moins une colonie d'ECFC chez 51 patients (38%). Nous avons obtenu de l'ADN en quantité suffisante et de bonne qualité pour 29 patients (22%). Parmi ces patients, 14 avaient des antécédents de thrombose, et nous n'avons pas retrouvé la présence de la mutation JAK2V617F dans les ECFC de ces patients. Nous émettons donc la conclusion que l'acquisition de la mutation JAK2V617F dans les ECFC est un phénomène très rare, et donc que l'acquisition de la mutation JAK2V617F par des CE s'effectue par d'autres mécanismes.

b. L'hypothèse d'un endothélium hémogénique

La recherche de l'existence d'un hémangioblaste chez l'adulte (en post-natal) s'est faite de manière concomitante à la recherche d'un autre phénomène, celui de l'existence d'un endothélium hémogénique. L'hypothèse de l'existence d'un endothélium hémogénique n'est pas éloignée de celle de l'existence d'un hémangioblaste, et pourrait la compléter. En effet, un hémangioblaste est une cellule non différenciée capable de donner naissance aux deux lignées hématopoiétique et endothéliale. Un endothélium hémogénique est constitué de cellules différenciées en cellules endothéliales mais dotées de la capacité de donner naissance à des cellules hématopoiétiques. Le phénomène d'endothélium hémogénique est reconnu chez l'embryon, avec l'existence maintenant reconnue d'un endothélium hémogénique au niveau de l'AGM, mais cette hypothèse est controversée chez l'adulte. En 2007, Wu et son équipe ont apporté des arguments pour l'existence d'un tel endothélium hémogénique en post-natal. Cette équipe a montré que des cellules immatures issues de sang de cordon, exprimant les marqueurs CD34+ et CD133+, cultivées dans un milieu endothélial-spécifique, donnaient lieu à des cellules endothéliales adhérentes mais également à des cellules non-adhérentes. Les auteurs ont étudié les propriétés de ces deux compartiments cellulaires, adhérentes et non-adhérentes, et premièrement montré que les cellules non-adhérentes exprimaient un marqueur nécessaire à l'hématopoïèse, AML1 (*acute myeloid leukemia* 1) ou RUNX1 (*runt-related transcription factor* 1). Dans un second temps, les auteurs ont montré que les deux compartiments cellulaires pouvaient donner naissance à des colonies hématopoiétiques. Enfin, pour démontrer la capacité des cellules adhérentes (avec phénotype de cellule endothéliale) à donner naissance à des colonies hématopoiétiques, les auteurs ont effectué des expériences de clonage à partir de cellules adhérentes, et montré qu'un certain nombre de cellules adhérentes pouvaient donner naissance à des colonies hématopoiétiques (BFU-E et CFU-GEMM). Cette étude a été la première à apporter des arguments en faveur de l'existence d'un endothélium hémogénique en post-natal **(Wu et al., 2007)**. En 2009, Lancrin et ses co-auteurs ont apporté de nouvelles données sur l'endothélium

hémogénique chez la souris et montré que les deux hypothèses (endothélium hémogénique et hémangioblaste) n'étaient pas conflictuelles mais s'inscrivaient plutôt dans un continuum temporel. En effet, dans cet article, les auteurs montraient qu'il y a passage entre un hémangioblaste (*blast-colony forming cell*, BC-FC, cellule KDR+) et un groupe de cellules exprimant les antigènes c-kit et Tie2 mais pas l'antigène CD41 (population $Tie2^{high}$ckit+CD41-) : cellules de l'endothélium hémogénique. En effet, ces cellules, à phénotype endothélial, ont des propriétés clonales, et peuvent donner naissance à des colonies hématopoiétiques. Dans cet article, les auteurs montrent que la mise en place de cet endothélium hémogénique nécessite l'expression du facteur de transcription Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia protein* 1), et que l'établissement de l'hématopoïèse définitive à partir de l'endothélium hémogénique nécessite l'expression du facteur de transcription RUNX1 **(Lancrin et al., 2009)**. D'autres facteurs semblent nécessaires à la transition de cellules endothéliales vers des progéniteurs hématopoiétiques : *core-binding factor* ß (CBF ß) **(Chen et al., 2011)**, GfI1 (*growth factor independent 1 transcriptional repressor)* et GfI1b **(Lancrin et al., 2012)(Hock et al., 2004)**. En 2014, des auteurs ont également montré que des cellules endothéliales matures pouvaient être reprogrammées en cellules hématopoiétiques pluri-potentes. Dans leur étude, Sandler et ses co-auteurs ont utilisé des cellules endothéliales veineuses de sang de cordon (HUVEC) et des cellules endothéliales dermiques humaines (hDMEC). En transduisant ces cellules avec quatre facteurs de transcription (*FosB, GfI1, RUNX1, SPI1*), dans un système de co-culture en présence de cellules endothéliales micro-vasculaires, les auteurs montraient que les cellules endothéliales matures pouvaient être reprogrammées en cellules hématopoiétiques mutlipotentes et dotées de propriétés clonogéniques **(Sandler et al., 2014)**.

Cet article intéressant nous a fait soulever l'hypothèse que la mutation JAK2V617F pourrait être acquise par des cellules endothéliales matures au niveau médullaire et que la mutation JAK2V617F pourrait induire une augmentation des taux de FosB, GfI1, RUNX1 ou SPI1 dans ces cellules. Cette augmentation de facteurs de transcription, cruciale pour la transition endothélio-hématopoiétique, pourrait participer à l'émergence de cellules hématopoiétiques avec mutation JAK2V617F à partir de cellules endothéliales matures.

Ainsi, des expériences préliminaires ont été débutées dans notre équipe par Oliver Mansier pour déterminer si la présence de la mutation JAK2V617F dans des cellules endothéliales mène à une augmentation en ARN des facteurs de transcription FosB, GFi1, RUNX1 et SPI1.

c. *L'hypothèse de l'intégration de cellules hématopoiétiques et/ou d'une différenciation hémato-endothéliale*

De manière schématique, et comme dit plus haut, des études ont montré que des cellules endothéliales pouvaient « dériver » de cellules souches hématopoiétiques médullaires **(Jiang et al., 2004)(Grant et al., 2002)(Bailey et al., 2004)**. Cela signe soit la présence d'un « hémangioblaste », soit l'intégration de cellules hématopoiétiques au niveau du compartiment endothélial. Deux types de cellules sont candidates à cette intégration : les monocytes/macrophages et/ou les CFU-EC (ou progéniteurs endothéliaux précoces). Les monocytes humains sont classés selon l'expression à leur surface des marqueurs CD14, CD16 et CD40 **(Appleby et al., 2013)**. Les monocytes CD14+ CD16-, ou monocytes « classiques », constituent la population la plus abondante de monocytes au niveau circulant. Les monocytes CD14+CD16+, monocytes dits « intermédiaires » entre les monocytes « classiques » et « non-classiques », contribuent à la physiopathologie de l'athérosclérose. Les monocytes CD14+CD16++ sont dénommés monocytes « non-classiques » et ont essentiellement une fonction de surveillance et de présentation d'antigène. En l'absence d'inflammation, les monocytes « classiques » peuvent se différencier en monocytes « intermédiaires » puis « non-classiques ». En présence d'inflammation, les monocytes vont se différencier en macrophages sous la dépendance de stimuli environnementaux et intégrer la paroi vasculaire. A noter que les macrophages sont également classés en plusieurs sous-types (macrophages M1, M2a, M2b, M2c, M4), chacun de ces sous-types possédant des fonctions différentes et étant activés par différentes cytokines fonction du sous-type **(Fang et al., 2018)**. De manière schématique, les macrophages M1 ont des fonctions pro-inflammatoires **(Martinez et al., 2008)**, tandis que les macrophages M2 aident à la résolution de l'inflammation et soutiennent l'angiogenèse **(He et al., 2012)**. Les mécanismes d'intégration des monocytes dans la paroi sont bien connus au cours de l'athérosclérose. Il est possible d'imaginer qu'une telle intégration, de monocytes JAK2V617F, se déroule au cours des NMP, notamment dans un contexte inflammatoire, permettant l'apport de la mutation JAK2V617F au niveau du compartiment endothélial mature. Il a également été montré que les progéniteurs endothéliaux précoces, ou CFU-EC, pouvaient s'intégrer dans une monocouche de cellules endothéliales (HUVEC) **(Hur et al., 2004)** et que l'immense majorité de ces CFU-EC possédait la mutation JAK2V617F **(Yoder et al., 2007)**. Ainsi, les CFU-EC peuvent représenter des cellules candidates pour l'apport de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial.

La différenciation d'une cellule hématopoiétique avec mutation JAK2V617F en cellule endothéliale pourrait également expliquer la survenue de la mutation JAK2V617F dans le

compartiment endothélial. On peut ainsi formuler l'hypothèse, à l'inverse de la transition endothélio-hématopoiétique, que la présence de la mutation JAK2V617F au sein d'une cellule hématopoiétique, pourrait favoriser sa différenciation en cellule endothéliale. Cette hypothèse peut d'ailleurs compléter et/ou suivre l'hypothèse précédente, c'est-à-dire, que l'intégration d'une cellule hématopoiétique peut être suivie d'une différenciation en cellule endothéliale. Il a d'ailleurs été montré dans des situations d'ischémie que des cellules issues de la moelle osseuse pouvaient se différencier en cellules endothéliales **(Orlic et al., 2001)(Kamihata et al., 2001)**.

Ainsi, Virginie Gourdou-Latyszenok, ingénieure dans notre équipe, a débuté des expériences préliminaires pour rechercher l'existence éventuelle d'une différenciation des cellules hématopoiétiques vers les cellules endothéliales. Pour cela, nous avons étudié les modèles murins *PF4iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ et *MRP8iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ qui permettent l'expression de la mutation JAK2V617F respectivement dans toutes les cellules hématopoiétiques ou uniquement dans la lignée granuleuse. En croisant ces souris avec des souris *mT/mG*, nous avons la capacité de suivre l'efficacité de recombinaison via l'expression de la protéine GFP. Afin de déterminer si des cellules hématopoiétiques peuvent se différencier en cellules endothéliales, nous avons analysé l'expression de la protéine GFP par les cellules endothéliales, via des techniques d'imagerie sur des vaisseaux « en face », et sur des vaisseaux isolés. La recombinaison survenant uniquement dans les cellules hématopoiétiques, nous formulons l'hypothèse que la présence de cellules endothéliales avec expression de GFP serait secondaire à la différenciation de cellules hématopoiétiques en cellules endothéliales ou à l'intégration de cellules hématopoiétiques dans la monocouche endothéliale. Les difficultés de ces expériences sont cependant de deux ordres. Premièrement, il est important de caractériser (sur un plan phénotypique) avec précision les cellules GFP positif afin de bien différencier les cellules hématopoiétiques des cellules endothéliales. Deuxièmement, la présence de cellules endothéliales GFP positif ne peut pas nous permettre d'exclure la présence d'un progéniteur commun aux deux lignées (hématopoiétique et endothéliale), les modèles *PF4iCre* et *MRP8iCre* étant des modèles constitutifs, et non inductibles. Il sera donc nécessaire, afin de s'affranchir de ce biais, de réaliser des expériences de transplantation de moelle de souris « JAK2V617F » et « GFP » (souris *PF4iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ ou mieux souris *VavCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$) dans des souris wild-type.

d. L'hypothèse du transfert génique

Même si cela semble moins probable, la possibilité de transfert d'ADN entre cellules a été démontrée il y a plusieurs années **(Holmgren et al., 2002)(Bergsmedh et al., 2001)**. Dans leur

étude, les auteurs montraient que des cellules lymphomateuses B étaient capables de « transférer » l'ADN du virus Ebstein-Barr (EBV) à des cellules endothéliales matures, via l'endocytose par les cellules endothéliales de corps apoptotiques **(Holmgren et al., 2002)**. En 2002, la même équipe a montré que l'ADN transmis aux cellules via les corps apoptotiques conférait à ces cellules un avantage prolifératif, participant à la tumorogenèse **(Bergsmedh et al., 2001)**. De manière complémentaire, le transfert de petits ARN et de protéines peut également advenir entre deux cellules, via les exosomes ou les microvésicules **(Lee et al., 2012)**. Cependant, cette hypothèse semble moins probable dans le cas des CE avec mutation JAK2V617F, la recherche de la mutation ayant été effectuée par PCR dans les cellules endothéliales.

B. L'ensemble de l'endothélium possède-t-il la mutation JAK2V617F ?

L'utilisation du modèle *PDGFCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ comme modèle d'étude des conséquences de la survenue de la mutation JAK2V617F au niveau des cellules endothéliales se heurte à une limite importante : l'ensemble (ou presque) des cellules endothéliales possèdent la mutation JAK2V617F. Nous sommes conscients que cette situation n'est vraisemblablement pas ce qui survient chez les patients avec NMP. En effet, la mutation JAK2V617F a été retrouvée chez les patients au niveau de cellules endothéliales matures isolées de capillaires hépatiques **(Sozer et al., 2009a)** et de capillaires spléniques **(Rosti et al., 2013)**. Ce modèle murin ne représente donc pas ce qui se passe chez les patients, mais constitue cependant un bon modèle d'étude et de caractérisation des CE avec mutation JAK2V617F *in vivo*. Chez les patients, nous pouvons émettre l'hypothèse que la présence de la mutation JAK2V617F au niveau des CE est ponctuelle, possiblement au niveau de sites soumis à un environnement inflammatoire, comme peut l'être le territoire hépatique. Cependant, les mécanismes en jeu, rejoignant la question des mécanismes responsables de l'existence de CE JAK2V617F, restent à élucider.

C. Quel est le mécanisme responsable de l'augmentation de P-Sélectine retrouvée à la surface des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F ?

Dans ce travail, nous avons démontré que l'augmentation de P-Sélectine à la surface des CE JAK2V617F était responsable d'un phénotype pro-adhésif et pro-thrombotique de ces cellules. Il est connu que la P-Selectine est responsable du rolling et de l'adhésion des leucocytes au niveau de l'endothélium **(Zarbock et al., 2011)**, participant ainsi à la physiopathologie de la

thrombose **(von Brühl et al., 2012)(Connolly et al., 1997)**. En revanche, nous n'avons pas retrouvé d'augmentation à la surface des autres molécules d'adhésion importante pour les interactions entre cellules endothéliales et leucocytes que sont ICAM-1, VCAM-1 ou la E-Selectine. Les mécanismes responsables d'une augmentation de P-Sélectine à la surface des cellules endothéliales JAK2V617F restent à élucider.

La première hypothèse est que la mutation JAK2V617F soit responsable d'une augmentation de STAT3 phosphorylée, à son tour responsable d'une augmentation de transcription de l'ADN de la P-Sélectine. Récemment, une étude a montré que l'activation de STAT3 au niveau de cellules endothéliales était responsable d'une augmentation des quantités de P-Selectine (ARN messager) **(Kim et al., 2017)**. Dans notre travail, nous montrons, de manière logique, que la quantité de STAT3 phosphorylée est augmentée dans les CE JAK2V617F. De plus, nous retrouvons une augmentation en ARN messager de la P-Selectine dans les CE JAK2V617F, plaidant en faveur de cette hypothèse.

La seconde hypothèse, qui peut compléter la première, est que la mutation JAK2V617F entraîne une augmentation de l'exoxytose des corps de Weibel-Palade. Les corps de Weibel-Palade contiennent de la P-Sélectine et du facteur Willebrand. Dans notre travail, nous avons montré une augmentation des taux de facteur Willebrand à la surface des HUVEC JAK2V617F, ainsi qu'une augmentation des taux antigéniques de facteur Willebrand chez les souris *PDGFCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$. Afin d'étayer cette hypothèse, il serait nécessaire d'explorer les voies responsables de l'exocytose des corps de Weibel-Palade et de rechercher une modulation de ces voies par la protéine JAK2V617F : notamment les voies de signalisation calcique **(Hamilton and Sims, 1987)** ou celles de l'adénosine monophopshate cyclique (AMPc) **(Vischer and Wollheim, 1997)**.

A noter qu'une autre équipe a également mis en évidence un phénotype pro-inflammatoire acquis par les cellules endothéliales JAK2V617F, dans un article publié récemment **(Guadall et al., 2018)**. Dans cet article, les auteurs ont utilisé des cellules endothéliales (endothelial like cells, ELC) dérivées de cellules pluri-potentes induites (induced pluripotent cells, IPS) obtenues de patients avec (IPS puis ELC JAK2V617F) la mutation JAK2V617F et de patients sans la mutation JAK2V617F (IPS puis ELC JAK2WT). Ils montrèrent premièrement, comme dans notre travail, que les ELC JAK2V617F avaient des taux de facteur Willebrand et de P-Selectine intra-cellulaire augmentés, ainsi que des taux de P-Selectine à la surface des ELC JAK2V617F augmentés. De manière intéressante, les auteurs ont également analysé le transcriptome des ELC JAK2V617F. Avec cette approche, les auteurs montraient une dérégulation des gènes codant pour les molécules d'adhésion cellulaire et de gènes impliqués dans la cascade de la coagulation.

Ils mettaient également en évidence une sur-représentation des gènes impliqués dans les réponses inflammatoires, dans les propriétés pro-adhésives (*CX3CL1, CXCL2, CXCR4, ALCAM, BST2, SELP*) et pro-thrombotiques (*IL1RL, SULF1*) des cellules endothéliales. Une confirmation de la surexpression de certains ARN (notamment *CX3CL1, CXCL2, SELP, IL1RL1*) a été réalisée par analyse par q-PCR dans les ELC JAK2V617F et WT. Enfin, les auteurs ont analysé l'adhésion de cellules mononuclées de patients contrôles et de patients avec NMP et, comme dans notre étude, ont mis en évidence une adhésion augmentée des cellules mononuclées en présence d'ELC JAK2V617F. A noter que l'adhésion de cellules mononuclées de patients était augmentée par rapport à l'adhésion de cellules mononuclées de témoins, confirmant l'activation des leucocytes au cours des NMP. Nous avons également analysé l'adhésion de polynucléaires neutrophiles de témoins et de patients avec NMP en présence d'HUVEC JAK2WT et d'HUVEC JAK2V617F (n= 6 patients) sans mettre en évidence une augmentation d'adhésion des PNN de patients par rapport aux témoins. Cependant, nous avons remarqué une diminution forte de l'adhésion des PNN de patients avec traitement cytoréducteur **(Figure 24)**. Au total, les résultats de cette étude sont en accord avec ceux que nous avons obtenu, confirmant une activation des CE en présence de la mutation JAK2V617F. De plus, comme dans notre travail, les auteurs mettent en évidence une surexpression de la P-sélectine et du facteur Willebrand à la surface des CE JAK2V617F.

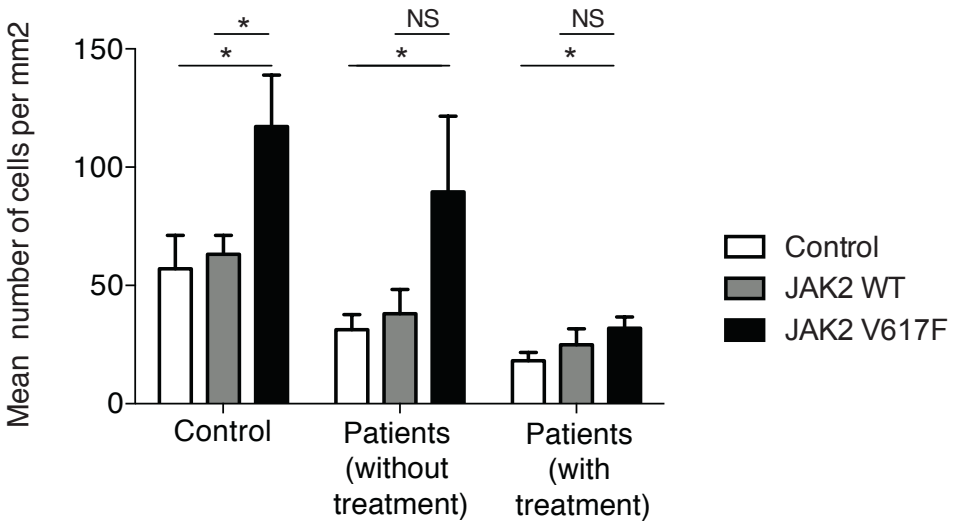


Figure 24. Données préliminaires sur l'adhésion de PNN de patients avec NMP en présence d'HUVEC JAK2WT et JAK2V617F.

*3 patients sans traitement cytoréducteur (CR) et 3 patients avec ont été étudiés. Patient 1 : PV, charge allélique JAK2V617F : 10% ; Patient 2 : PV, charge allélique JAK2V617F : 27% ; Patient 3 : TE, charge allélique : 4% ; Patient 4 : PV, charge allélique JAK2V617F : 51%, traitement par Hydroxyurée ; Patient 5 : MFP, charge allélique JAK2V617F : 14%, traitement Ruxolitinib : Patient 6 : TE, charge allélique JAK2V617F : 15%, traitement par Hydroxyurée. Test t de Student. *p< 0,05.*

D. Quelles seraient les éventuelles conséquences thérapeutiques de ce travail ?

Nous avons montré que l'inhibition de l'expression de P-Sélectine conduisait à une diminution de l'adhésion des cellules mononuclées et des neutrophiles in vitro et in vivo. De plus, nous avons montré que l'inhibition de l'expression de la P-Sélectine permettait la prévention de la survenue de thromboses au niveau pulmonaire chez les souris *PDGFb-iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$. Ces données ouvrent la voie à d'éventuelles thérapeutiques anti-thrombotiques futures qui cibleraient la P-Selectine. Un anticorps bloquant la P-Sélectine, le crizanlizumab, a été étudié au cours de la drépanocytose dans un essai randomisé contre placebo, et a montré une efficacité sur la survenue de crises vaso-occlusives au cours de cette maladie **(Ataga et al., 2017)**. A noter que cibler la P-Sélectine aurait probablement des conséquences sur le compartiment endothélial, mais également sur les plaquettes et indirectement sur les polynucléaires neutrophiles et la formation de NET (les plaquettes favorisant la formation de NET via l'interaction P-Sélectine/PSGL1).

Dans ce travail, nous montrons également que l'hydroxyurée (HU) joue un rôle direct sur les cellules endothéliales. Utilisé en pratique clinique à visée cytoréductrice, cette donnée ouvre la voie à d'autres mécanismes d'action de l'HU, avec potentiellement des conséquences en terme de prévention de la survenue d'évènements thrombotiques. Utilisé également au cours de la drépanocytose afin d'augmenter les taux d'hémoglobine fœtale (HbF), il a été montré au cours de cette maladie que l'HU jouait un rôle direct au niveau des cellules endothéliales (activation de la voie du NO et de la guanosine monophosphate cyclique) et permettait de diminuer l'adhésion des leucocytes au niveau des cellules endothéliales en conditions inflammatoires **(Almeida et al., 2012)**. Récemment, la même équipe a montré, dans un modèle d'hémolyse, que l'administration d'HU diminuait l'expression de VCAM-1 et de E-Sélectine médiée par la présence d'hémoglobine au niveau des cellules endothéliales **(Almeida et al., 2015)**. Nous montrons ici que l'administration d'HU entraîne une diminution de l'adhésion et du rolling des leucocytes in vivo, une diminution de l'adhésion des leucocytes in vitro, et une diminution des taux de P-Selectine et facteur Willebrand dans les souris *PDGFb-iCre ;JAK2*$^{V617F/WT}$. Les mécanismes responsables du rôle de l'HU sur les cellules endothéliales restent encore à élucider, même si nous avons montré que l'HU entraînait une diminution d'expression de pSTAT3 dans les HUVEC JAK2V617F, suggérant donc une inhibition de la voie JAK/STAT. En pratique clinique, cela suggère que l'HU pourrait avoir des bénéfices supérieurs aux autres thérapeutiques en terme de prévention de la survenue de thrombose chez les patients avec NMP.

2ème partie : Etude du rôle des polynucléaires neutrophiles et du phénomène de NETose dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myélo-prolifératives avec mutation JAK2V617F

I. Principaux résultats obtenus

A. Au sein d'une cohorte de patients avec NMP

Dans cette seconde partie, nous avons étudié une cohorte de patients avec NMP. De manière originale, nous avons choisi de sélectionner uniquement les patients vus au diagnostic avant le début du traitement et donc naïfs de tout traitement cytoréducteur. Cette méthode nous a ainsi permis d'écarter un biais lié aux traitements administrés, qui modifient les propriétés des PNN et des autres cellules sanguines.

Comme démontré par de précédentes études, nous avons confirmé que les marqueurs d'activation (CD11b et facteur tissulaire) étaient augmentés à la surface des polynucléaires neutrophiles (PNN). Afin d'étudier le phénomène de formation de NET de manière « directe », nous avons quantifié la NETose *ex vivo* et constaté que la formation de NET était augmentée chez les patients avec NMP. Cette augmentation de NETose était également associée à une augmentation des marqueurs indirects de NETose au niveau plasmatique : taux d'ADN plasmatique et taux de MPO-ADN plasmatique. Etant donné que l'objectif principal de ce travail était d'analyser le lien entre formation de NET et survenue de thrombose chez les patients avec NMP, nous avons, pour chaque paramètre analysé, quantifié celui-ci chez les patients avec antécédents de thrombose en comparaison avec les patients sans antécédents de thrombose. Nous avons, de cette façon, pu mettre en évidence que les patients avec antécédents de thrombose avaient des taux de MPO-ADN plasmatique significativement plus élevés que les patients sans antécédents de thrombose, suggérant qu'une formation de NET augmentée serait associée à une augmentation de la survenue de thrombose. Nous n'avons pas retrouvé de différences concernant les autres marqueurs analysés. Afin d'étudier les mécanismes intra-cellulaires en jeu dans cette formation de NET accrue, nous avons premièrement analysé la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (reactive oxygene species ou ROS), cette voie étant cruciale dans la formation de NET. Ainsi, nous avons constaté que les PNN de patients avec NMP avaient une formation de ROS très augmentée par rapport aux patients témoins.

En conclusion de cette première partie, nous avons pu démontrer que la formation de NET était augmentée chez les patients avec NMP naïfs de traitement cytoréducteur. De manière intéressante, nous avons également mis en évidence qu'un marqueur spécifique de NETose, le MPO-ADN plasmatique, était augmenté chez les patients avec NMP ayant déjà thrombosé, suggérant une association entre NETose et survenue de thrombose au cours des NMP.

B. A l'aide de modèles murins

Afin d'étudier plus précisément le rôle de la NETose dans la physiopathologie de la thrombose des NMP, ainsi que les mécanismes en jeu dans l'augmentation de NETose constatée dans notre cohorte de patients, nous avons dans un second temps étudié deux modèles murins différents permettant l'expression de la mutation JAK2V617F au niveau des cellules hématopoiétiques : les modèles *PF4Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$* et *MRP8Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$*. Le modèle *PF4Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$* permet l'expression de la mutation JAK2V617F dans toutes les cellules sanguines, menant au développement d'un syndrome myéloprolifératif. Le modèle *MRP8Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$* permet l'expression spécifique de la mutation JAK2V617F dans la lignée granuleuse, sans développement d'un syndrome myéloprolifératif.

Nous avons premièrement mis en évidence que la formation de NET était augmentée dans ces deux modèles, confirmant ce que nous avions observé dans la cohorte de patients avec NMP. Deuxièmement, nous avons constaté que la formation de thrombi était augmentée au niveau pulmonaire chez les souris *PF4Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$*, et que cette formation de thrombi était inhibée par un traitement dirigé contre les NET, la DNAse. Dans le même temps, nous avons constaté que les souris *MRP8Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$* n'avaient pas une formation de thrombi augmentée au niveau pulmonaire.

Ces données nous ont donc permis d'émettre les conclusions suivantes : la formation de NET augmentée participe à la physiopathologie de la thrombose (augmentation de thrombose chez les souris *PF4Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$* avec inhibition de la thrombose par la DNAse) avec cependant nécessité de la participation d'autres acteurs dans cette physiopathologie (absence de différence de thrombose chez les souris *MRP8Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$*). Ainsi, devant les données disponibles dans la littérature sur le rôle des plaquettes dans l'activation de la NETose **(Etulain et al., 2015)(Clark et al., 2007)**, nous avons focalisé notre attention sur le rôle des plaquettes dans l'activation des neutrophiles et avons constaté, à l'aide d'expériences réalisées ex-vivo, que

la présence de plaquettes avec mutation JAK2V617F était nécessaire pour déclencher la formation de NET à partir de PNN également mutés JAK2V617F. Ces données suggèrent donc que les plaquettes JAK2V617F déclenchent la formation de NET de PNN JAK2V617F.

Au total, nous avons démontré que la formation de NET était augmentée dans deux modèles murins différents, et que cette formation de NET participait à la physiopathologie de la thrombose. De manière intéressante, nous avons également observé que la collaboration entre les plaquettes mutées JAK2V617F et les PNN mutés JAK2V617F participait à la formation de NET augmentée, suggérant la nécessité d'une interaction entre ces deux types cellulaires pour induire la thrombose au cours des NMP avec mutation JAK2V617F.

II. Limites, questions soulevées et perspectives futures

A. Ces résultats sont-ils concordants avec les résultats d'études antérieures ?

L'étude du phénomène de NETose au cours des NMP a été menée par deux équipes, de manière parallèle à notre travail, avec des publications réalisées en 2015 et en 2018 : une étude parue en 2015 réalisée par une équipe argentine (équipe de Heller) **(Oyarzún et al., 2016)** et une étude parue tout récemment en 2018, réalisée par une équipe américaine (équipe de Wagner) **(Wolach et al., 2018b)**. Je présenterai dans ce paragraphe les principaux résultats de ces études, avec les concordances et discordances que nous retrouvons, et l'apport de notre travail par rapport à ces deux études.

Concernant la formation de NET ex-vivo, l'équipe de Heller a montré que les PNN de patients avec NMP ne formaient pas plus de NET de manière spontanée, et en présence d'activateurs de la NETose : TNF-alpha et IL8. A l'inverse, cette équipe a montré que les PNN de patients formaient moins de NET que les PNN de patients contrôles en présence de PMA. Quant à elle, l'équipe de Denisa Wagner a montré, comme nous le faisons ici, que les PNN de patients de leur cohorte formaient plus de NET en présence d'un activateur calcique, la ionomycine. De plus, les auteurs retrouvaient une abolition de la formation de NET ex vivo chez les patients traités par ruxolitinib (inhibiteur de JAK2 et JAK1), et à partir de PNN de patients témoins pré-traités par du ruxolitinib. Nous retrouvons également une formation de NET augmentée, cependant de manière spontanée, et non en présence d'un inducteur comme l'a mis en évidence l'équipe de Wagner. A noter que dans les deux autres études, les cohortes étudiées

comportaient des patients avec traitement cytoréducteur et sans traitement cytoréducteur, alors que nous avons étudié uniquement des patients naïfs de tout traitement. Cette différence d'inclusion peut expliquer pourquoi nous mettons en évidence une différence de formation de NET de manière spontanée entre les patients avec NMP et les patients contrôles, de manière discordante avec les résultats de ces deux autres équipes.

Concernant les marqueurs indirects de NETose chez les patients avec NMP, l'équipe de Heller a retrouvé dans leur cohorte des taux plus élevés de nucléosomes au niveau plasmatique, en discordance avec leurs résultats concernant la formation de NET ex-vivo. Nous retrouvons des résultats en accord avec ceux-ci, avec des taux d'ADN plasmatique et de MPO-ADN augmentés dans le plasma des patients de notre cohorte. De plus, alors que cette équipe ne retrouve pas d'association entre le taux de nucléosomes circulants et la survenue de thrombose, nous montrons que les taux de MPO-ADN sont augmentés chez les patients avec antécédents de thrombose. La différence entre ces deux résultats vient possiblement d'une plus grande spécificité du marqueur « MPO-ADN » par rapport à la mesure des nucléosomes. De plus, nous retrouvons des résultats similaires dans notre modèle *PF4Cre;JAK2*$^{V617F/WT}$ avec des taux d'ADN plasmatique augmentés. L'équipe de Wagner n'a quant à elle pas étudié les marqueurs indirects de NETose dans leur cohorte de patients, mais a retrouvé des taux d'ADN plasmatique augmentés chez les souris *VavCre;JAK2*^{V617F} utilisées dans leur étude.

Concernant l'étude du métabolisme oxydatif des PNN au cours des NMP, l'équipe de Heller retrouvait une formation de ROS augmentée chez les patients avec NMP, ce que nous mettons en évidence également dans notre travail. Cela avait d'ailleurs été retrouvé précédemment par une autre équipe **(Hurtado-Nedelec et al., 2013)**. De manière complémentaire, nous avons également analysé la formation de ROS dans les PNN des souris *MRP8Cre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ sans retrouver de différence entre les souris avec mutation JAK2V617F et les souris contrôles. L'absence de différence retrouvée vient possiblement de la sonde de détection utilisée, le dihydroethidium (DHE), qui mesure uniquement la production d'anion superoxyde, et non le métabolisme oxydatif de manière globale comme peut le faire la sonde CM-H2DCFDA utilisée chez les patients. Nos résultats concernant l'étude des ROS chez la souris sont comparables aux résultats de l'équipe de Denisa Wagner qui ne retrouvait pas d'augmentation de la production de ROS dans les PNN de leur modèle murin *VavCre ;JAK2*^{V617F}.

Concernant l'étude de la formation de thrombose, seule l'équipe de Wagner a analysé un modèle murin. Cette équipe a utilisé le modèle *Vav;Cre*, modèle permettant une recombinaison dans l'ensemble des cellules hématopoiétiques mais également dans les cellules endothéliales, ce qui peut éventuellement entraîner un biais dans les résultats compte tenu du rôle des CE avec mutation JAK2V617F dans la thrombose. Dans ce modèle, les auteurs retrouvaient une augmentation de la formation de thrombose de manière spontanée au niveau pulmonaire avec mise en évidence de NET (marquage de l'histone H3 citrullinée) au niveau des thrombi. Dans un second temps, les auteurs utilisaient des souris greffées avec de la moelle de souris *VavCre ;JAK2*^{V617F} (afin d'exclure le biais lié à la présence de la mutation JAK2V617F au niveau des cellules endothéliales) et analysaient la survenue de thrombose dans un modèle de sténose de la veine cave inférieure. Ils montrèrent ainsi que la formation de thrombi était augmentée chez les souris greffées avec de la moelle de souris *VavCre ;JAK2*^{V617F}, par rapport aux souris contrôles. Cette formation de thrombose augmentée était inhibée par un traitement par Ruxolitinib, ainsi que par un traitement par DNAse. Enfin, les auteurs ont étudié la survenue de thrombose spontanée chez des souris greffées avec des cellules c-kit+ de souris déficientes en PAD4 (PAD4-/-) transduites avec un lentivirus JAK2V617F. Dans ce modèle déficient en PAD4, les auteurs montrèrent une diminution de la formation de NET ainsi qu'une diminution de la survenue de thrombi, confirmant l'importance de cette enzyme dans la NETose et la physiopathologie de la thrombose des NMP. Nous retrouvons des résultats concordants, avec une formation de thrombi augmentée dans notre modèle murin *PF4Cre;JAK2*$^{V617F/WT}$ et une inhibition de la formation de thrombose en présence d'un traitement par DNAse.

Au total, notre travail confirme les résultats retrouvés par ces deux équipes, avec quelques différences que j'ai rapportées ci-dessus. Notre travail a cependant des points originaux, qui permettent de compléter les données des précédentes études. Premièrement, nous avons étudié un nombre important de patients avec NMP, permettant l'obtention d'une puissance importante. De plus, nous avons obtenu des données à partir de patients naïfs de tout traitement, ce qui n'est pas le cas des deux études parues précédemment. Cela est un point important, étant données les modifications apportées par un traitement cytoréducteur au niveau des cellules sanguines. Nous avons également mise en évidence un éventuel biomarqueur associé à la thrombose, le taux de MPO-ADN plasmatique, ce qui n'avait jamais été retrouvé précédemment.

Enfin, nos expériences ont porté sur deux modèles murins, différents de ceux précédemment étudiés, et complémentaires concernant l'étude des mécanismes en jeu dans la formation de NET au cours des NMP. Le modèle *PF4Cre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ permet l'obtention chez

la souris d'un syndrome myéloprolifératif, similaire à ce qui peut être retrouvé chez les patients puisque uniquement de rares CSH sont mutées. Mais surtout, point original, nous avons étudié un modèle permettant une recombinaison spécifique au niveau de la lignée granuleuse, le modèle *MRP8Cre ;JAK2*$^{V617F/WT}$. Ce modèle nous a permis de montrer que la formation de NET accrue retrouvée au cours des NMP était médiée par deux « grands » mécanismes : une activation intrinsèque du PNN par la mutation JAK2V617F (augmentation de la formation de NET ex-vivo) et une activation extrinsèque du PNN par les plaquettes avec mutation JAK2V617F.

B. Quels sont les mécanismes responsables de l'augmentation de la formation de NET constatée au cours des NMP ?

Dans notre travail, nous avons mis en évidence plusieurs aspects du mécanisme en jeu dans l'augmentation de NETose constatée au cours des NMP.

Premièrement, l'étude des modèles murins a permis de mettre en évidence une participation probable de la mutation JAK2V617F en elle-même, devant l'observation que la NETose était augmentée chez les souris *MRP8Cre;JAK2*$^{V617F/WT}$ par rapport aux souris contrôles. Cependant, la présence de la mutation JAK2V617F ne suffit probablement pas à déclencher la NETose. En effet, nous avons constaté une augmentation de NETose en présence de stimulation des PNN par du PMA, et non de manière spontanée. Dans les perspectives, il serait intéressant d'analyser plus précisément le rôle de la mutation JAK2V617F dans les mécanismes intra-cellulaires d'induction de la NETose **(Figure 25)**. Une des hypothèses soulevées par ce travail est celle d'un lien entre la mutation JAK2V617F et la production de ROS intra-cellulaire. Un tel lien a précédemment été retrouvé dans deux études antérieures. L'étude de Marty et de ses co-auteurs avait démontré que la mutation JAK2V617F était responsable d'une diminution du taux de catalase intra-cellulaire, via l'activation de la voie PI3K/AKT , au sein de cellules de la moelle osseuse **(Marty et al., 2013)**. L'étude de Hurtado-Nedelec a quant à elle montré que la production de ROS était augmentée dans des PNN de patients avec NMP, avec activation de la voie ERK et augmentation de la phosphorylation de la protéine p47phox, composant du complexe de la NADPH-oxydase **(Hurtado-Nedelec et al., 2013)**. Il serait donc intéressant d'analyser la formation de NET en présence d'un traitement inhibiteur du métabolisme oxydatif, comme la N-acétyl-cystéine (NAC). Enfin, les données apportées par l'équipe de Wagner, montrant que le ruxolitinib inhibe la formation de NET à partir de PNN de patients, suggère un lien direct entre la mutation JAK2V617F et la formation de NET, même si le ruxolitinib n'est pas un inhibiteur spécifique de JAK2, ni de JAK2V617F.

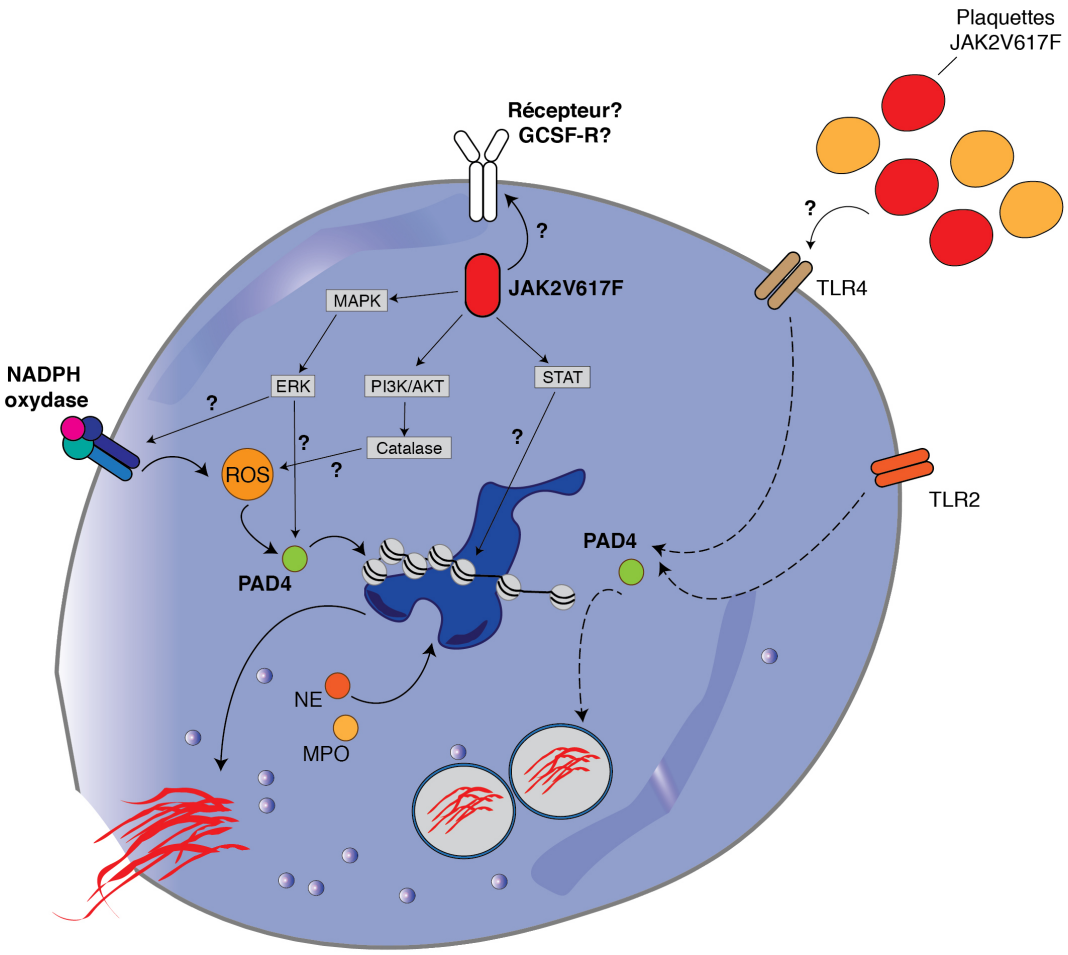


Figure 25 : Hypothèses de mécanismes de promotion de la NETose par la mutation JAK2V617F
La mutation JAK2V617F pourrait entraîner une augmentation de ROS intra-cellulaire via la voie des MAP kinases et la protéine ERK, ou via la voie PI3K/AKT et la protéine catalase. JAK2V617F pourrait également activer la voie STAT, avec régulation de la transcription génique. D'autres voies pourraient également exister entre la mutation JAK2V617F et la protéine PAD4, protéine cruciale dans le déclenchement de la NETose. Le récepteur aux cytokines auquel se rattacherait la protéine JAK2V617F pourrait être le récepteur au G-CSF. Les plaquettes JAK2V617F pourraient activer le PNN via la voie du TLR4.

Nous avons également mis en évidence que les plaquettes avec mutation JAK2V617F induisaient une formation de NET augmentée à partir de PNN mutés JAK2V617F. Cela suggère que les plaquettes isolées des souris *PF4Cre:JAK2*$^{V617F/WT}$ sont activées. Comme dit en introduction, les résultats concernant l'étude des fonctions plaquettaires dans les modèles murins de NMP JAK2V617F sont discordants : certaines équipes ont montré une activation plaquettaire **(Hobbs et al., 2013)**, alors que d'autres non **(Lamrani et al., 2014)(Etheridge et al., 2014)**. Les différents modèles utilisés participaient vraisemblablement de ces différences retrouvées. Chez les patients, les données sont plus consensuelles avec des arguments pour une activation plaquettaire au cours des NMP. Ces résultats amènent donc plusieurs perspectives. Premièrement, il serait intéressant d'étudier les fonctions plaquettaires des plaquettes des souris

PF4Cre ;JAK2$^{V617F/WT}$ (étude en cytométrie en flux des principales glycoprotéines à l'état basal et à l'état activé, étude de l'agrégation plaquettaire). Il serait également intéressant de confirmer une activation plaquettaire chez les patients avec NMP et de réaliser des expériences de mise en présence de plaquettes de patients avec des neutrophiles de patients. Nous risquons cependant d'être confrontés à des variations de charge allélique entre les patients, et donc de ne pas pouvoir être certains du caractère muté ou non des cellules étudiées ex vivo. Enfin, il serait intéressant d'étudier la formation de NET chez des souris *PF4Cre ;JAK2*$^{V617F/WT}$ préalablement traitées par un inhibiteur des fonctions plaquettaires, comme l'aspirine, tout comme étudier l'induction de la NETose à partir de plaquettes de patients non ou alors préalablement traitées par aspirine.

Utilisant un modèle murin déficient en PAD4, l'étude du groupe de D. Wagner a confirmé le rôle crucial de cette enzyme dans la formation de NET au cours des NMP, ainsi que dans la survenue de thrombose dans un modèle murin *Vav;Cre*. Cependant, même si le taux d'enzyme PAD4 est augmenté dans les PNN de patients avec NMP, il serait intéressant de préciser quelles sont les voies intra-cellulaires menant à cette activation et quels sont les inducteurs de cette activation au cours des NMP : activation par la protéine JAK2V617F et/ou activation par un inducteur extra-cellulaire et/ou activation par les plaquettes et/ou activation par des cytokines inflammatoires ?

C. Le dosage de MPO-ADN plasmatique est-il un marqueur prometteur de thrombose au cours des NMP ?

Nous avons démontré que les taux de MPO-ADN plasmatiques étaient augmentés chez les patients avec NMP et antécédents de thrombose. Il s'agit d'une donnée intéressante car cela suggère que les patients ayant une formation de NET augmentée ont un risque de thrombose augmenté au cours des NMP. Nous avons cependant conscience que ces données ne nous permettent pas de conclure à une causalité entre la formation de NET et la survenue de thrombose. A noter également que nous n'avons pas mis en évidence de différence de taux de MPO-ADN plasmatique en fonction du délai entre le dosage et la survenue de thrombose, c'est-à-dire que des taux élevés de MPO-ADN ne signent pas la survenue récente d'une thrombose. De plus, nous n'avons retenu que les prélèvements situés au-delà d'un délai de 2 mois depuis un épisode thrombotique.

Devant ces résultats, va être mise en place une étude multicentrique ayant pour objectif principal d'évaluer une éventuelle corrélation entre le taux de MPO-ADN et le score prédictif de thrombose au cours de la TE (score IPSET-thrombosis) (appel à projet FORCE-HEMATO).

Au total, le dosage de MPO-ADN semble être un marqueur intéressant d'évaluation de la NETose, et pourrait potentiellement constituer un marqueur pronostique de thrombose au cours des NMP. A terme, il serait également intéressant d'évaluer l'utilité de ce marqueur, en dehors des NMP, dans le domaine des maladies thrombotiques.

3ème partie : Un lien entre nos deux principaux axes de travail ?

Dans le premier axe de travail, nous avons démontré que les cellules endothéliales (CE) JAK2V617F participaient à la physiopathologie de la thrombose via une augmentation de P-Sélectine et de facteur Willebrand à leur surface et une augmentation de l'adhésion et du rolling des leucocytes à leur surface.

Dans le second axe de travail, nous avons démontré que les polynucléaires neutrophiles (PNN) des patients formaient plus de NET. Chez la souris, nous avons démontré que la formation de NET était augmentée, participant à la propension de ces souris à former des thrombi au niveau pulmonaire.

Ces données nous permettent d'imaginer de nouveaux axes de travail, **transversaux entre ces deux thématiques**. Il est probable qu'ait lieu une activation réciproque entre les PNN et les cellules endothéliales au cours des NMP, médiée notamment par la mutation JAK2V617F **(Figure 26)**.

Ainsi, il serait intéressant :

- **D'étudier la NETose de PNN de patients témoins et de patients avec NMP en présence de CE JAK2V617F**. L'hypothèse sous-jacente est celle d'une activation des PNN et d'un déclenchement de la NETose par les CE JAK2V617F.

- **D'étudier l'activation des CE non mutées ou avec mutation JAK2V617F en présence de PNN avec mutation JAK2V617F**. L'hypothèse sous-jacente est celle d'une activation des CE par les PNN avec mutation JAK2V167F. Nous pourrions ainsi analyser l'expression de P-Sélectine et de facteur Willebrand à la surface des CE, après contact avec des PNN contrôles et des PNN avec mutation JAK2V617F.

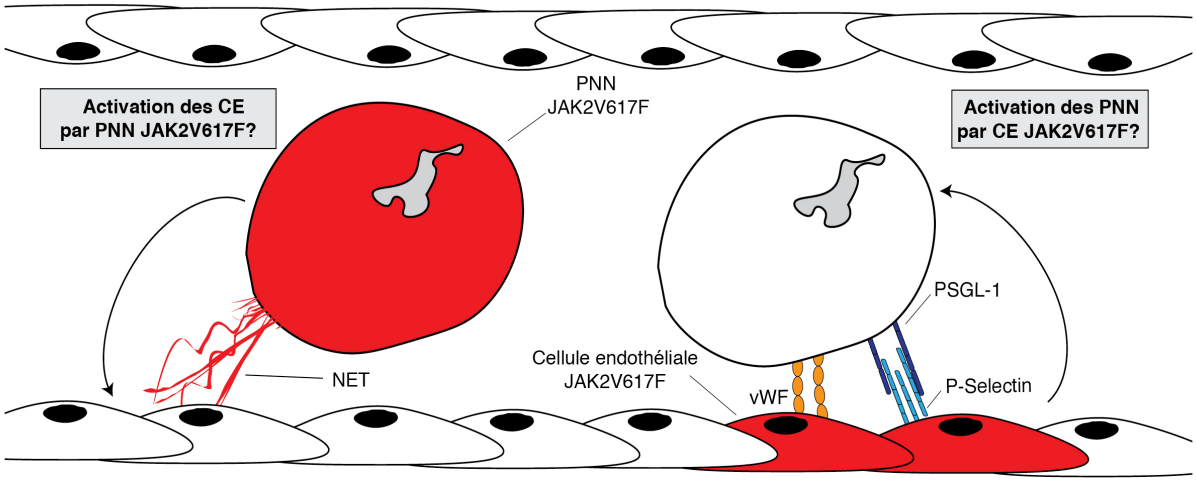


Figure 26 : Mécanismes possibles d'interaction entre les cellules endothéliales JAK2V167F et les polynucléaires neutrophiles avec mutation JAK2V617F

Il est possible que les polynucléaires neutrophiles (PNN) avec mutation JAK2V617F activent les cellules endothéliales (CE) via une augmentation de formation de NET. A l'inverse, il est possible que les CE avec mutation JAK2V617F activent les PNN, provoquant une activation des PNN, et une formation de NET augmentée.

Publications et communications

Publications :

Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N, Peghaire C, Kilani B, Vieira Dias J, Duplaa C, Renault MA, Denis C, Villeval JL, Boulaftali Y, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T, James C. *Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression*. Haematologica. 2018. doi : 10.3324/haematol.2018.19532.

Lapoirie J, Contis A, Guy A, Lifermann F, Viallard JF, Sentilhes L, James C, Duffau P *Management and outcomes of 27 pregnancies in women with myeloproliferative neoplasms.* The Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine. 2018. doi: 10.1080/14767058.2018.1484097.

Caradu C, Guy A, James C, Reynaud A, Gadeau AP, Renault MA. *Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice*. Cardiovascular Research. 2018. 114, 759–770.

Rivière E, Viallard JF, Guy A, Kilani B, Vieira Dias J, Pons AC, Couffinhal T, Pellegrin JL, James C. *Intrinsically impaired platelet production in some patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia.* British Journal of Haematology. 2015. 10.1111/bjh.13444.

Crombe A, Alberti N, Gilles M, Guy A, De Roquefeuil E, Dousset V, Tourdias T. (2015). *Extensive acute toxic leukoencephalopathy induced by fludarabine: two months follow-up on brain MRI*. Journal of Neuroradiology. 2015. 10.1016/j.neurorad.2014.08.001.

Communications orales :

- Guy A, Deloison L, Gourdou-Latyszenok V, Favre S, Colomer S, James C. *Neutrophils prothrombotic characteristics during myeloproliferative neoplasms.* **European Congress on Thrombosis and Haemostasis, Marseille, 2018** (accepted for oral communication)

- Guy A, Deloison L, Gourdou-Latyszenok V, James C. *Neutrophils prothrombotic characteristics during myeloproliferative neoplasms.* **French Society of Haematology Congress, Paris, 2018**

- Guy A, Deloison L, Gourdou-Latyszenok V, James C. *Neutrophils prothrombotic characteristics during myeloproliferative neoplasms.* **International Society of Thrombosis and Hemostasis Congress, Berlin, 2017**

- Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le-Lay N, Vieira Dias J, Kilani B, Peghaire C, Duplaa C, Denis C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T, James C. *Endothelial cells are important players in the pathogenesis of thrombosis in myeloproliferative neoplasms.* **International Society of Thrombosis and Hemostasis Congress, Berlin, 2017**

- Guy A, Deloison L, Gourdou-Latyszenok V, James C. *Neutrophils prothrombotic characteristics during myeloproliferative neoplasms.* **French Group of Hemostasis and Thrombosis Studies Congress, Caen, 2017**

- Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le-Lay N, Vieira Dias J, Kilani B, Peghaire C, Peghaire C, Duplaa C, Denis C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T, James C. *Endothelial cells are important players in the pathogenesis of thrombosis in myeloproliferative neoplasms.* **European School of Haematology on Myeloproliferative Neoplasms Meeting, Estoril, 2016**

- Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le-Lay N, Vieira Dias J, Kilani B, Peghaire C, Peghaire C, Duplaa C, Denis C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T, James C. *Endothelial cells are important players in the pathogenesis of thrombosis in myeloproliferative neoplasms.* **French Society of Haematology Congress, Paris, 2016**

- Guy A, Deloison L, Gourdou-Latyszenok V, James C. *Neutrophils prothrombotic characteristics during myeloproliferative neoplasms.* **French Society of Haematology Congress, Paris, 2016**

Communications affichées :

- Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le-Lay N, Vieira Dias J, Kilani B, Peghaire C, Peghaire C, Duplaa C, Denis C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T, James C. *Endothelial cells are important players in the pathogenesis of thrombosis in myeloproliferative neoplasms*. **French Group of Hemostasis and Thrombosis Studies Congress, Tours, 2016**

- Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le-Lay N, Vieira Dias J, Kilani B, Peghaire C, Peghaire C, Duplaa C, Denis C, Villeval JL, Jandrot-Perrus M, Couffinhal T, James C. *Endothelial cells are important players in the pathogenesis of thrombosis in myeloproliferative neoplasms*. **International Society of Thrombosis and Hemostasis Congress, Montpellier, 2016**

- Kilani B, Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Peghaire C, Vieira Dias J, Parrens M, Petit M, Duplaa C, Villeval J, Rautou PE, Souyri M, Couffinhal T, James C. *What is the best animal model to specifically target endothelial cells, without concomitant involvement of the hematopoietic lineage?* **International Society of Thrombosis and Hemostasis Congress, Montpellier, 2016**

- Kilani B, Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Peghaire C, Vieira Dias J, Parrens M, Petit M, Duplaa C, Villeval J, Rautou PE, Souyri M, Couffinhal T, James C. *What is the best animal model to specifically target endothelial cells, without concomitant involvement of the hematopoietic lineage?* **Spring of Cardiology, Dijon, 2016**

Références

Akhmedov, A.T., and Marín-García, J. (2015). Mitochondrial DNA maintenance: an appraisal. Mol. Cell. Biochem. *409*, 283–305.

Akong-Moore, K., Chow, O.A., von Köckritz-Blickwede, M., and Nizet, V. (2012). Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation. PloS One *7*, e42984.

Allen, D.H., and Tracy, P.B. (1995). Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. J. Biol. Chem. *270*, 1408–1415.

Almeida, C.B., Scheiermann, C., Jang, J.-E., Prophete, C., Costa, F.F., Conran, N., and Frenette, P.S. (2012). Hydroxyurea and a cGMP-amplifying agent have immediate benefits on acute vaso-occlusive events in sickle cell disease mice. Blood *120*, 2879–2888.

Almeida, C.B., Souza, L.E.B., Leonardo, F.C., Costa, F.T.M., Werneck, C.C., Covas, D.T., Costa, F.F., and Conran, N. (2015). Acute hemolytic vascular inflammatory processes are prevented by nitric oxide replacement or a single dose of hydroxyurea. Blood *126*, 711–720.

Alonci, A., Allegra, A., Bellomo, G., Penna, G., D'Angelo, A., Quartarone, E., and Musolino, C. (2008). Evaluation of circulating endothelial cells, VEGF and VEGFR2 serum levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. Hematol. Oncol. *26*, 235–239.

Alvarez, D.F., Huang, L., King, J.A., ElZarrad, M.K., Yoder, M.C., and Stevens, T. (2008). Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity. Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol. *294*, L419–L430.

Alvarez-Larrán, A., Arellano-Rodrigo, E., Reverter, J.C., Domingo, A., Villamor, N., Colomer, D., and Cervantes, F. (2008). Increased platelet, leukocyte, and coagulation activation in primary myelofibrosis. Ann. Hematol. *87*, 269–276.

Alvarez-Larran, A., Cervantes, F., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Perez-Andreu, V., Hernandez-Boluda, J.-C., Ayats, R., Salvador, C., Muntanola, A., Bellosillo, B., et al. (2010). Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. Blood *116*, 1205–1210.

Alvarez-Larran, A., Pereira, A., Cervantes, F., Arellano-Rodrigo, E., Hernandez-Boluda, J.-C., Ferrer-Marin, F., Angona, A., Gomez, M., Muina, B., Guillen, H., et al. (2012). Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. Blood *119*, 1363–1369.

Alvarez-Larrán, A., Pereira, A., Arellano-Rodrigo, E., Hernández-Boluda, J.-C., Cervantes, F., and Besses, C. (2013). Cytoreduction plus low-dose aspirin versus cytoreduction alone as primary prophylaxis of thrombosis in patients with high-risk essential thrombocythaemia: an observational study. Br. J. Haematol. *161*, 865–871.

Alvarez-Larrán, A., Martínez-Avilés, L., Hernández-Boluda, J.C., Ferrer-Marín, F., Antelo, M.L., Burgaleta, C., Mata, M.I., Xicoy, B., Martínez-Trillos, A., Gómez-Casares, M.T., et al.

(2014). Busulfan in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia refractory or intolerant to hydroxyurea. Ann. Hematol. *93*, 2037–2043.

Alvarez-Larrán, A., Kerguelen, A., Hernández-Boluda, J.C., Pérez-Encinas, M., Ferrer-Marín, F., Bárez, A., Martínez-López, J., Cuevas, B., Mata, M.I., García-Gutiérrez, V., et al. (2015). Frequency and prognostic value of resistance/intolerance to hydroxycarbamide in 890 patients with polycythaemia vera. Br. J. Haematol. *172*, 786–793.

Alvarez-Larran, A., Pereira, A., Guglielmelli, P., Hernandez-Boluda, J.C., Arellano-Rodrigo, E., Ferrer-Marin, F., Samah, A., Griesshammer, M., Kerguelen, A., Andreasson, B., et al. (2016). Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. Haematologica *101*, 926–931.

Alvarez-Larrán, A., Pérez-Encinas, M., Ferrer-Marín, F., Hernández-Boluda, J.C., Ramírez, M.J., Martínez-López, J., Magro, E., Cruz, Y., Mata, M.I., Aragües, P., et al. (2017). Risk of thrombosis according to need of phlebotomies in patients with polycythemia vera treated with hydroxyurea. Haematologica *102*, 103–109.

Amitrano, L., Guardascione, M.A., Scaglione, M., Pezzullo, L., Sangiuliano, N., Armellino, M.F., Manguso, F., Margaglione, M., Ames, P.R.J., Iannaccone, L., et al. (2007). Prognostic Factors in Noncirrhotic Patients With Splanchnic Vein Thromboses. Am. J. Gastroenterol. *102*, 2464–2470.

Andre, P., Hartwell, D., Hrachovinova, I., Saffaripour, S., and Wagner, D.D. (2000). Pro-coagulant state resulting from high levels of soluble P-selectin in blood. Proc. Natl. Acad. Sci. *97*, 13835–13840.

Antonioli, E., Guglielmelli, P., Poli, G., Bogani, C., Pancrazzi, A., Longo, G., Ponziani, V., Tozzi, L., Pieri, L., Santini, V., et al. (2008). Influence of JAK2V617F allele burden on phenotype in essential thrombocythemia. Haematologica *93*, 41–48.

Appleby, L.J., Nausch, N., Midzi, N., Mduluza, T., Allen, J.E., and Mutapi, F. (2013). Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. Immunol. Lett. *152*, 32–41.

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

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

Arellano-Rodrigo, E., Alvarez-Larrán, A., Reverter, J.C., Villamor, N., Colomer, D., and Cervantes, F. (2006). Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. Haematologica 7.

Arellano-Rodrigo, E., Alvarez-Larrán, A., Reverter, J.-C., Colomer, D., Villamor, N., Bellosillo, B., and Cervantes, F. (2008). Platelet turnover, coagulation factors, and soluble markers of platelet and endothelial activation in essential thrombocythemia: Relationship with thrombosis occurrence and JAK2 V617F allele burden. Am. J. Hematol. *84*, 102–108.

Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., and Isner, J.M. (1997). Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. Science *275*, 964–966.

Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J.M. (1999). Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. Circ. Res. *85*, 221–228.

Ataga, K.I., Kutlar, A., Kanter, J., Liles, D., Cancado, R., Friedrisch, J., Guthrie, T.H., Knight-Madden, J., Alvarez, O.A., Gordeuk, V.R., et al. (2017). Crizanlizumab for the Prevention of Pain Crises in Sickle Cell Disease. N. Engl. J. Med. *376*, 429–439.

Au, P., Daheron, L.M., Duda, D.G., Cohen, K.S., Tyrrell, J.A., Lanning, R.M., Fukumura, D., Scadden, D.T., and Jain, R.K. (2007). Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. Blood *111*, 1302–1305.

Bahlmann, F.H., De Groot, K., Spandau, J.-M., Landree, A., Hertel, B., Duckert, T., Boehm, S., Menne, J., Haller, H., and Fliser, D. (2003). Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. Blood *103*, 921–926.

Bailey, A.S., Jiang, S., Afentoulis, M., Baumann, C., Schroeder, D., Olson, S., Wong, M., and Fleming, W.H. (2004). Transplanted adult hematopoietic stems cells differentiate into functional endothelial cells. Blood *103*, 13–19.

Baker, R.I., and Manoharan, A. (1988). Platelet function in myeloproliferative disorders: Characterization and sequential studies show multiple platelet abnormalities, and change with time. Eur. J. Haematol. *40*, 267–272.

Baker, S.J., Rane, S.G., and Reddy, E.P. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. Oncogene *26*, 6724–6737.

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

Bandaranayake, R.M., Ungureanu, D., Shan, Y., Shaw, D.E., Silvennoinen, O., and Hubbard, S.R. (2012). Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. Nat. Struct. Mol. Biol. *19*, 754–759.

Barbui, T., Carobbio, A., Cervantes, F., Vannucchi, A.M., Guglielmelli, P., Antonioli, E., Alvarez-Larran, A., Rambaldi, A., Finazzi, G., and Barosi, G. (2010). Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. Blood *115*, 778–782.

Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., d'Amore, E.S.G., Randi, M.L., Bertozzi, I., et al. (2011a). Survival and Disease Progression in Essential Thrombocythemia Are Significantly Influenced by Accurate Morphologic Diagnosis: An International Study. J. Clin. Oncol. *29*, 3179–3184.

Barbui, T., Barosi, G., Birgegard, G., Cervantes, F., Finazzi, G., Griesshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H.C., Hehlmann, R., Hoffman, R., et al. (2011b). Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. J. Clin. Oncol. *29*, 761–770.

Barbui, T., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Boveri, E., Randi, M.L., Bertozzi, I., Marino, F., Vannucchi, A.M., Pieri, L., et al. (2012a). Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. Blood *119*, 2239–2241.

Barbui, T., Thiele, J., Carobbio, A., Passamonti, F., Rumi, E., Randi, M.L., Bertozzi, I., Vannucchi, A.M., Gisslinger, H., Gisslinger, B., et al. (2012b). Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. Blood *120*, 569–571.

Barbui, T., Finazzi, G., Carobbio, A., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Bertozzi, I., et al. (2012c). Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). Blood *120*, 5128–5133.

Barbui, T., Thiele, J., Gisslinger, H., Finazzi, G., Carobbio, A., Rumi, E., Randi, M.L., Betozzi, I., Vannucchi, A.M., Pieri, L., et al. (2014a). Masked polycythemia Vera (mPV): Results of an international study. Am. J. Hematol. *89*, 52–54.

Barbui, T., Thiele, J., Carobbio, A., Guglielmelli, P., Rambaldi, A., Vannucchi, A.M., and Tefferi, A. (2014b). Discriminating between essential thrombocythemia and masked polycythemia vera in JAK2 mutated patients. Am. J. Hematol. *89*, 588–590.

Barbui, T., Vannucchi, A.M., Carobbio, A., Thiele, J., Rumi, E., Gisslinger, H., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Rambaldi, A., Pieri, L., et al. (2015a). Patterns of presentation and thrombosis outcome in patients with polycythemia vera strictly defined by WHO-criteria and stratified by calendar period of diagnosis. Am. J. Hematol. *90*, 434–437.

Barbui, T., Vannucchi, A.M., Buxhofer-Ausch, V., De Stefano, V., Betti, S., Rambaldi, A., Rumi, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., et al. (2015b). Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. Blood Cancer J. *5*, e369–e369.

Barbui, T., Vannucchi, A.M., Carobbio, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Ruggeri, M., Randi, M.L., Cazzola, M., Rambaldi, A., et al. (2017). The effect of arterial hypertension on thrombosis in low-risk polycythemia vera. Am. J. Hematol. *92*, E5–E6.

Barosi, G., Rosti, V., Bonetti, E., Campanelli, R., Carolei, A., Catarsi, P., Isgrò, A.M., Lupo, L., Massa, M., Poletto, V., et al. (2012). Evidence that Prefibrotic Myelofibrosis Is Aligned along a Clinical and Biological Continuum Featuring Primary Myelofibrosis. PLoS ONE *7*, e35631.

Barosi, G., Mesa, R., Finazzi, G., Harrison, C., Kiladjian, J.-J., Lengfelder, E., McMullin, M.F., Passamonti, F., Vannucchi, A.M., Besses, C., et al. (2013). Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. Blood *121*, 4778–4781.

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

Belaaouaj, A., McCarthy, R., Baumann, M., Gao, Z., Ley, T.J., Abraham, S.N., and Shapiro, S.D. (1998). Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. Nat. Med. *4*, 615–618.

Belotti, A., Elli, E., Speranza, T., Lanzi, E., Pioltelli, P., and Pogliani, E. (2011). Circulating endothelial cells and endothelial activation in essential thrombocythemia: Results from CD146+ immunomagnetic enrichment—flow cytometry and soluble E-selectin detection. Am. J. Hematol. *87*, 319–320.

Bergamaschi, G.M., Primignani, M., Barosi, G., Fabris, F.M., Villani, L., Reati, R., Dell'Era, A., and Mannucci, P.M. (2008). MPL and JAK2 exon 12 mutations in patients with the Budd-Chiari syndrome or extrahepatic portal vein obstruction. Blood *111*, 4418–4418.

Bergsmedh, A., Szeles, A., Henriksson, M., Bratt, A., Folkman, M.J., Spetz, A.-L., and Holmgren, L. (2001). Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 6407–6411.

Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J., and Dong, J.-F. (2004). Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow. Blood *104*, 100–106.

Bertozzi, I., Peroni, E., Coltro, G., Bogoni, G., Cosi, E., Santarossa, C., Fabris, F., and Randi, M.L. (2016a). Thrombotic risk correlates with mutational status in true essential thrombocythemia. Eur. J. Clin. Invest. *46*, 683–689.

Bertozzi, I., Peroni, E., Coltro, G., Bogoni, G., Cosi, E., Santarossa, C., Fabris, F., and Randi, M.L. (2016b). Thrombotic risk correlates with mutational status in true essential thrombocythemia. Eur. J. Clin. Invest. *46*, 683–689.

Boisset, J.-C., van Cappellen, W., Andrieu-Soler, C., Galjart, N., Dzierzak, E., and Robin, C. (2010). In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. Nature *464*, 116–120.

Bompais, H., Chagraoui, J., Canron, X., Crisan, M., Hui Lui, X., Anjo, A., Tolla-Le-Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., et al. (2004). Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. Blood *103*, 2577–2584.

Borissoff, J.I., Joosen, I.A., Versteylen, M.O., Brill, A., Fuchs, T.A., Savchenko, A.S., Gallant, M., Martinod, K., ten Cate, H., Hofstra, L., et al. (2013). Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin Are Independently Associated With Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 2032–2040.

Borowczyk, M., Wojtaszewska, M., Lewandowski, K., Gil, L., Lewandowska, M., Lehmann-Kopydłowska, A., Kroll-Balcerzak, R., Balcerzak, A., Iwoła, M., Michalak, M., et al. (2015). The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms.

Thromb. Res. *135*, 272–280.

Boulanger, C.M., Loyer, X., Rautou, P.-E., and Amabile, N. (2017). Extracellular vesicles in coronary artery disease. Nat. Rev. Cardiol. *14*, 259–272.

Bozeman, P.M., Learn, D.B., and Thomas, E.L. (1990). Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. J. Immunol. Methods *126*, 125–133.

Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., and Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. Nat. Immunol. *15*, 1017–1025.

Brill, A., Fuchs, T.A., Chauhan, A.K., Yang, J.J., De Meyer, S.F., Kollnberger, M., Wakefield, T.W., Lammle, B., Massberg, S., and Wagner, D.D. (2011). von Willebrand factor-mediated platelet adhesion is critical for deep vein thrombosis in mouse models. Blood *117*, 1400–1407.

Brill, A., Fuchs, T.A., Savchenko, A.S., Thomas, G.M., Martinod, K., De Meyer, S.F., Bhandari, A.A., and Wagner, D.D. (2012). Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice: NETs promote deep vein thrombosis. J. Thromb. Haemost. *10*, 136–144.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. Science *303*, 1532–1535.

von Brühl, M.-L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Köllnberger, M., et al. (2012). Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. J. Exp. Med. *209*, 819–835.

Bucalossi, A., Marotta, G., Bigazzi, C., Galieni, P., and Dispensa, E. (1996). Reduction of antithrombin III, protein C, and protein S levels and activated protein C resistance in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients with thrombosis. Am. J. Hematol. *52*, 14–20.

Budde, U., Scharf, R.E., Franke, P., Hartmann-Budde, K., Dent, J., and Ruggeri, Z. (1993). Elevated Platelet Count as a Cause of Abnormal von Willebrand Factor Multimer Distribution in Plasma. Blood 10.

Bumm, T.G.P., Elsea, C., Corbin, A.S., Loriaux, M., Sherbenou, D., Wood, L., Deininger, J., Silver, R.T., Druker, B.J., and Deininger, M.W.N. (2006). Characterization of Murine JAK2V617F-Positive Myeloproliferative Disease. Cancer Res. *66*, 11156–11165.

Butenas, S., Bouchard, B., Brummel-Ziedens, K., Parhami-Seren, B., and Mann, K. (2005). Tissue factor activity in whole blood. Blood *105*, 2764–2770.

Buxhofer-Ausch, V., Gisslinger, B., Schalling, M., Gleiss, A., Schiefer, A.-I., Müllauer, L., Thiele, J., Kralovics, R., and Gisslinger, H. (2016). Impact of white blood cell counts at diagnosis and during follow-up in patients with essential thrombocythaemia and prefibrotic primary myelofibrosis. Br. J. Haematol. *179*, 166–169.

Cabagnols, X., Defour, J.P., Ugo, V., Ianotto, J.C., Mossuz, P., Mondet, J., Girodon, F.,

Alexandre, J.H., Mansier, O., Viallard, J.F., et al. (2015). Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. Leukemia *29*, 249–252.

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

Calaminus, S.D.J., Guitart, A., Sinclair, A., Schachtner, H., Watson, S.P., Holyoake, T.L., Kranc, K.R., and Machesky, L.M. (2012). Lineage Tracing of Pf4-Cre Marks Hematopoietic Stem Cells and Their Progeny. PLoS ONE *7*, e51361.

Campbell, A.M., Kashgarian, M., and Shlomchik, M.J. (2012a). NADPH Oxidase Inhibits the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. Sci. Transl. Med. *4*, 157ra141-157ra141.

Campbell, P.J., MacLean, C., Beer, P.A., Buck, G., Wheatley, K., Kiladjian, J.-J., Forsyth, C., Harrison, C.N., and Green, A.R. (2012b). Correlation of blood counts with vascular complications in essential thrombocythemia: analysis of the prospective PT1 cohort. Blood *120*, 1409–1411.

Carobbio, A., Finazzi, G., Guerini, V., Spinelli, O., Delaini, F., Marchioli, R., Borrelli, G., Rambaldi, A., and Barbui, T. (2007). Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. Blood *109*, 2310–2313.

Carobbio, A., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., Delaini, F., Guerini, V., Finazzi, G., Rambaldi, A., and Barbui, T. (2008a). Leukocytosis and Risk Stratification Assessment in Essential Thrombocythemia. J. Clin. Oncol. *26*, 2732–2736.

Carobbio, A., Finazzi, G., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., Delaini, F., Guerini, V., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Rambaldi, A., et al. (2008b). Thrombocytosis and leukocytosis interaction in vascular complications of essential thrombocythemia. Blood *112*, 3135–3137.

Carobbio, A., Finazzi, G., Antonioli, E., Vannucchi, A.M., Barosi, G., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Delaini, F., Rambaldi, A., and Barbui, T. (2010). Hydroxyurea in essential thrombocythemia: rate and clinical relevance of responses by European LeukemiaNet criteria. Blood *116*, 1051–1055.

Carobbio, A., Thiele, J., Passamonti, F., Rumi, E., Ruggeri, M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Bertozzi, I., Vannucchi, A.M., Antonioli, E., et al. (2011). Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. Blood *117*, 5857–5859.

Case, J., Mead, L.E., Bessler, W.K., Prater, D., White, H.A., Saadatzadeh, M.R., Bhavsar, J.R., Yoder, M.C., Haneline, L.S., and Ingram, D.A. (2007). Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. Exp. Hematol. *35*, 1109–1118.

Castaldi, P.A., Berndt, M.C., Booth, W., Gregory, C., Bull, H., and Greaves, M. (1982).

Evidence for a platelet membrane defect in the myeloproliferative syndromes. Thromb. Res. *27*, 601–609.

Cedervall, J., Zhang, Y., Huang, H., Zhang, L., Femel, J., Dimberg, A., and Olsson, A.-K. (2015). Neutrophil Extracellular Traps Accumulate in Peripheral Blood Vessels and Compromise Organ Function in Tumor-Bearing Animals. Cancer Res. *75*, 2653–2662.

Cella, G., Marchetti, M., Vianello, F., Panova-Noeva, M., Vignoli, A., Russo, L., Barbui, T., and Falanga, A. (2010). Nitric oxide derivatives and soluble plasma selectins in patients with myeloproliferative neoplasms. Thromb. Haemost. *104*, 151–156.

Cerquozzi, S., and Tefferi, A. (2015). Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. Blood Cancer J. *5*, e366–e366.

Cervantes, F., Alvarez-Larrán, A., Arellano-Rodrigo, E., Granell, M., Domingo, A., and Montserrat, E. (2006). Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. Leukemia *20*, 55–60.

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

Charpentier, A., Lebreton, A., Rauch, A., Bauters, A., Trillot, N., Nibourel, O., Tintillier, V., Wemeau, M., Demory, J.-L., Preudhomme, C., et al. (2016). Microparticle phenotypes are associated with driver mutations and distinct thrombotic risks in essential thrombocythemia. Haematologica *101*, e365–e368.

Chauhan, A.K., Motto, D.G., Lamb, C.B., Bergmeier, W., Dockal, M., Plaimauer, B., Scheiflinger, F., Ginsburg, D., and Wagner, D.D. (2006). Systemic antithrombotic effects of ADAMTS13. J. Exp. Med. *203*, 767–776.

Chen, M.J., Li, Y., De Obaldia, M.E., Yang, Q., Yzaguirre, A.D., Yamada-Inagawa, T., Vink, C.S., Bhandoola, A., Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2011). Erythroid/Myeloid Progenitors and Hematopoietic Stem Cells Originate from Distinct Populations of Endothelial Cells. Cell Stem Cell *9*, 541–552.

Chim, C.-S., Kwong, Y.-L., Lie, A.K.-W., Ma, S.-K., Chan, C.-C., Wong, L.-G., Kho, B.C.S., Lee, H.-K., Sim, J.P.-Y., Chan, C.-H., et al. (2005). Long-term outcome of 231 patients with essential thrombocythemia: prognostic factors for thrombosis, bleeding, myelofibrosis, and leukemia. Arch. Intern. Med. *165*, 2651–2658.

Cho, J., Furie, B.C., Coughlin, S.R., and Furie, B. (2008). A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. J. Clin. Invest.

Choi, K., Kennedy, M., Kazarov, A., Papadimitriou, J.C., and Keller, G. (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development 8.

Chow, O.A., von Köckritz-Blickwede, M., Bright, A.T., Hensler, M.E., Zinkernagel, A.S., Cogen, A.L., Gallo, R.L., Monestier, M., Wang, Y., Glass, C.K., et al. (2010). Statins Enhance Formation of Phagocyte Extracellular Traps. Cell Host Microbe *8*, 445–454.

Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat. Med. *13*, 463–469.

Colaizzo, D., Amitrano, L., Iannaccone, L., Vergura, P., Cappucci, F., Grandone, E., Guardascione, M.A., and Margaglione, M. (2007). Gain-of-function gene mutations and venous thromboembolism: distinct roles in different clinical settings. J. Med. Genet. *44*, 412–416.

Connolly, E.S., Winfree, C.J., Prestigiacomo, C.J., Kim, S.C., Choudhri, T.F., Hoh, B.L., Naka, Y., Solomon, R.A., and Pinsky, D.J. (1997). Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. Circ. Res. *81*, 304–310.

Cortelazzo, S., Viero, P., Finazzi, G., D'Emilio, A., Rodeghiero, F., and Barbui, T. (1990). Incidence and risk factors for thrombotic complications in a historical cohort of 100 patients with essential thrombocythemia. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *8*, 556–562.

Cortelazzo, S., Finazzi, G., Ruggeri, M., Vestri, O., Galli, M., Rodeghiero, F., and Barbui, T. (1995). Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. N. Engl. J. Med. *332*, 1132–1137.

Crisà, E., Venturino, E., Passera, R., Prina, M., Schinco, P., Borchiellini, A., Giai, V., Ciocca Vasino, M.A., Bazzan, M., Vaccarino, A., et al. (2010). 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*, 691–699.

Crosby, J.R., Kaminski, W.E., Schatteman, G., Martin, P.J., Raines, E.W., Seifert, R.A., and Bowen-Pope, D.F. (2000). Endothelial Cells of Hematopoietic Origin Make a Significant Contribution to Adult Blood Vessel Formation. Circ. Res. *87*, 728–730.

Cugno, M., Marzano, A.V., Lorini, M., Carbonelli, V., and Tedeschi, A. (2014). Enhanced Tissue Factor Expression by Blood Eosinophils from Patients with Hypereosinophilia: A Possible Link with Thrombosis. PLoS ONE *9*, e111862.

Darbousset, R., Thomas, G.M., Mezouar, S., Frere, C., Bonier, R., Mackman, N., Renne, T., Dignat-George, F., Dubois, C., and Panicot-Dubois, L. (2012). Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. Blood *120*, 2133–2143.

Darbousset, R., Delierneux, C., Mezouar, S., Hego, A., Lecut, C., Guillaumat, I., Riederer, M.A., Evans, R.J., Dignat-George, F., Panicot-Dubois, L., et al. (2014). P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. Blood *124*, 2575–2585.

Davis, J.C., Manzi, S., Yarboro, C., Rairie, J., Mcinnes, I., Averthelyi, D., Sinicropi, D., Hale, V.G., Balow, J., Austin, H., et al. (1999). Recombinant human Dnase I (rhDNase) in patients with lupus nephritis. Lupus *8*, 68–76.

De Grandis, M., Cambot, M., Wautier, M.-P., Cassinat, B., Chomienne, C., Colin, Y., Wautier, J.-L., Le Van Kim, C., and El Nemer, W. (2013). JAK2V617F activates Lu/BCAM-mediated red

cell adhesion in polycythemia vera through an EpoR-independent Rap1/Akt pathway. Blood *121*, 658–665.

De Meyer, S.F., Suidan, G.L., Fuchs, T.A., Monestier, M., and Wagner, D.D. (2012a). Extracellular Chromatin Is an Important Mediator of Ischemic Stroke in Mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 1884–1891.

De Meyer, S.F., Savchenko, A.S., Haas, M.S., Schatzberg, D., Carroll, M.C., Schiviz, A., Dietrich, B., Rottensteiner, H., Scheiflinger, F., and Wagner, D.D. (2012b). Protective anti-inflammatory effect of ADAMTS13 on myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. Blood *120*, 5217–5223.

De Palma, M., Venneri, M.A., Roca, C., and Naldini, L. (2003). Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. Nat. Med. *9*, 789–795.

De Stefano, V., Za, T., Rossi, E., Vannucchi, A.M., Ruggeri, M., Elli, E., Mico, C., Tieghi, A., Cacciola, R.R., Santoro, C., et al. (2008). Recurrent thrombosis in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia: incidence, risk factors, and effect of treatments. Haematologica *93*, 372–380.

De Stefano, V., Za, T., Rossi, E., Vannucchi, A.M., Ruggeri, M., Elli, E., Micò, C., Tieghi, A., Cacciola, R.R., Santoro, C., et al. (2009). Leukocytosis is a risk factor for recurrent arterial thrombosis in young patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. Am. J. Hematol. *85*, 97–100.

De Stefano, V., Vannucchi, A.M., Ruggeri, M., Cervantes, F., Alvarez-Larrán, A., Iurlo, A., Randi, M.L., Pieri, L., Rossi, E., Guglielmelli, P., et al. (2016). Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms: risk factors for recurrences in a cohort of 181 patients. Blood Cancer J. *6*, e493–e493.

Defour, J.-P., Chachoua, I., Pecquet, C., and Constantinescu, S.N. (2016). Oncogenic activation of MPL/thrombopoietin receptor by 17 mutations at W515: implications for myeloproliferative neoplasms. Leukemia *30*, 1214–1216.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le-Couedic, J.-P., Robert, F., Alberti, A., et al. (2009). Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. N. Engl. J. Med. 13.

Demers, M., and Wagner, D.D. (2014). NETosis: a new factor in tumor progression and cancer-associated thrombosis. Semin. Thromb. Hemost. *40*, 277–283.

Demers, M., Krause, D.S., Schatzberg, D., Martinod, K., Voorhees, J.R., Fuchs, T.A., Scadden, D.T., and Wagner, D.D. (2012). Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 13076–13081.

D'Emilio, A., Battista, R., Dini, E., Messinezy, M., Pearson, T.C., Prochazka, A., and Wetherley-Mein, G. (1987). Treatment of Primary Proliferative Polycythaemia by Venesection and Busulphan. Br. J. Haematol. *65*, 121–122.

Di Minno, M.N.D., Ageno, W., Lupoli, R., Conte, G., van Es, N., Buller, H.R., and Dentali, F.

(2017). Direct oral anticoagulants for the treatment of acute venous thromboembolism in patients with cancer: a meta-analysis of randomised controlled trials. Eur. Respir. J. *50*, 1701097.

Di Nisio, M., Barbui, T., Gennaro, L.D., Borrelli, G., Finazzi, G., Landolfi, R., Leone, G., Marfisi, R., Porreca, E., Ruggeri, M., et al. (2006). The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. Br. J. Haematol. *136*, 249–259.

Diaz, J.A., Fuchs, T.A., Jackson, T.O., Kremer Hovinga, J.A., Lämmle, B., Henke, P.K., Myers, D.D., Wagner, D.D., and Wakefield, T.W. (2013). Plasma DNA is elevated in patients with deep vein thrombosis. J. Vasc. Surg. Venous Lymphat. Disord. *1*, 341-348.e1.

Dienava-Verdoold, I., Marchetti, M.R., te Boome, L.C.J., Russo, L., Falanga, A., Koene, H.R., Mertens, K., and Brinkman, H.J.M. (2012). Platelet-mediated proteolytic down regulation of the anticoagulant activity of protein S in individuals with haematological malignancies. Thromb. Haemost. *107*, 468–476.

Dillinger, J.-G., Sollier, C.B. dit, Sideris, G., Ronez, E., Henry, P., and Drouet, L. (2012). Twice daily aspirin to improve biological aspirin efficacy in patients with essential thrombocytemia. Thromb. Res. *129*, 91–94.

Dimmeler, S., Aicher, A., Vasa, M., Mildner-Rihm, C., Adler, K., Tiemann, M., Rütten, H., Fichtlscherer, S., Martin, H., and Zeiher, A.M. (2001). HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. J. Clin. Invest. *108*, 391–397.

Dombi, P., Illés, Á., Demeter, J., Homor, L., Simon, Z., Karadi, E., Udvardy, M., and Egyed, M. (2016). Anagrelide reduces thrombotic risk in essential thrombocythaemia vs. hydroxyurea plus aspirin. Eur. J. Haematol. *98*, 106–111.

Douglas, G., Harrison, C., Forsyth, C., Bennett, M., Stevenson, W., Hounsell, J., Ratnasingam, S., Ritchie, D., Ross, D.M., and Grigg, A. (2017). Busulfan is effective second-line therapy for older patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms intolerant of or unresponsive to hydroxyurea. Leuk. Lymphoma *58*, 89–95.

Duchemin, J., Ugo, V., Ianotto, J.-C., Lecucq, L., Mercier, B., and Abgrall, J.-F. (2010). Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms. Thromb. Res. *126*, 238–242.

Edelmann, B., Gupta, N., Schnöder, T.M., Oelschlegel, A.M., Shahzad, K., Goldschmidt, J., Philipsen, L., Weinert, S., Ghosh, A., Saalfeld, F.C., et al. (2018). JAK2-V617F promotes venous thrombosis through β1/β2 integrin activation. J. Clin. Invest.

Elliott, M.A., and Tefferi, A. (2004). Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. Br. J. Haematol. *128*, 275–290.

Engel, P.J., Johnson, H., Baughman, R.P., and Richards, A.I. (2005). High-output heart failure associated with anagrelide therapy for essential thrombocytosis. Ann. Intern. Med. *143*, 311–313.

Engelmann, B., and Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. Nat. Rev. Immunol. *13*, 34–45.

Esmon, C.T., and Esmon, N.L. (2011). The Link Between Vascular Features and Thrombosis. Annu. Rev. Physiol. *73*, 503–514.

Etheridge, S.L., Roh, M.E., Cosgrove, M.E., Sangkhae, V., Fox, N.E., Chen, J., López, J.A., Kaushansky, K., and Hitchcock, I.S. (2014). JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 2295–2300.

Etulain, J., Martinod, K., Wong, S.L., Cifuni, S.M., Schattner, M., and Wagner, D.D. (2015). P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. Blood *126*, 242–246.

Falanga, A., Marchetti, M., Evangelista, V., Vignoli, A., Licini, M., Balicco, M., Manarini, S., Finazzi, G., Cerletti, C., and Barbui, T. (2000). Polymorphonuclear leukocyte activation and hemostasis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood *96*, 7.

Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., Balducci, D., and Barbui, T. (2005). Leukocyte-platelet interaction in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Exp. Hematol. *33*, 523–530.

Falanga, A., Marchetti, M., Vignoli, A., Balducci, D., Russo, L., Guerini, V., and Barbui, T. (2007). V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. Exp. Hematol. *35*, 702–711.

Fang, B., Zheng, C., Liao, L., Han, Q., Sun, Z., Jiang, X., and Zhao, R. (2005). Identification of human chronic myelogenous leukemia progenitor cells with hemangioblastic characteristics. Blood *105*, 2733–2740.

Fang, P., Li, X., Dai, J., Cole, L., Camacho, J.A., Zhang, Y., Ji, Y., Wang, J., Yang, X.-F., and Wang, H. (2018). Immune cell subset differentiation and tissue inflammation. J. Hematol. Oncol.J Hematol Oncol *11*.

Fang, S., Wei, J., Pentinmikko, N., Leinonen, H., and Salven, P. (2012). Generation of Functional Blood Vessels from a Single c-kit+ Adult Vascular Endothelial Stem Cell. PLoS Biol. *10*.

Fehling, H.J., Lacaud, G., Kubo, A., Kennedy, M., Robertson, S., Keller, G., and Kouskoff, V. (2003). Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. Development *130*, 4217–4227.

Feng, J., Witthuhn, B.A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I.M., and Ihle, J.N. (1997). Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. Mol. Cell. Biol. *17*, 2497–2501.

Finazzi, G., Caruso, V., Marchioli, R., Capnist, G., Chisesi, T., Finelli, C., Gugliotta, L., Landolfi, R., Kutti, J., Gisslinger, H., et al. (2005). Acute leukemia in polycythemia vera: an analysis of 1638 patients enrolled in a prospective observational study. Blood *105*, 2664–2670.

Finazzi, M.C., Carobbio, A., Cervantes, F., Isola, I.M., Vannucchi, A.M., Guglielmelli, P., Rambaldi, A., Finazzi, G., Barosi, G., and Barbui, T. (2015). CALR mutation, MPL mutation and triple negativity identify patients with the lowest vascular risk in primary myelofibrosis. Leukemia *29*, 1209–1210.

Fiorini, A., Chiusolo, P., Rossi, E., Za, T., Ritis, D.G.D., Ciminello, A., Leone, G., and Stefano, V.D. (2008). Absence of the JAK2 exon 12 mutations in patients with splanchnic venous thrombosis and without overt myeloproliferative neoplasms. Am. J. Hematol. *84*, 126–127.

Fleischhacker, M., and Schmidt, B. (2007). Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer—A survey. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer *1775*, 181–232.

Freedman, J.E., and Loscalzo, J. (2003). Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. J. Thromb. Haemost. *1*, 1183–1188.

Fruchtman, S.M., Mack, K., Kaplan, M.E., Peterson, P., Berk, P.D., and Wasserman, L.R. (1997). From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. Semin. Hematol. *34*, 17–23.

Fuchs, T.A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D.D., Wrobleski, S.K., Wakefield, T.W., Hartwig, J.H., and Wagner, D.D. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl. Acad. Sci. *107*, 15880–15885.

Fuchs, T.A., Bhandari, A.A., and Wagner, D.D. (2011). Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. Blood *118*, 3708–3714.

Fuchs, T.A., Brill, A., and Wagner, D.D. (2012a). Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *32*, 1777–1783.

Fuchs, T.A., Kremer Hovinga, J.A., Schatzberg, D., Wagner, D.D., and Lammle, B. (2012b). Circulating DNA and myeloperoxidase indicate disease activity in patients with thrombotic microangiopathies. Blood *120*, 1157–1164.

Furie, B., and Furie, B.C. (1992). Molecular and cellular biology of blood coagulation. N. Engl. J. Med. *326*, 800–806.

Furie, B., and Furie, B.C. (2008). Mechanisms of Thrombus Formation. N. Engl. J. Med. *359*, 938–949.

Furlan, M., and Robles, R. (1996). Partial Purification and Characterization of a Protease From Human Plasma Cleaving von Willebrand Factor to Fragments Produced by In Vivo Proteolysis. Blood 13.

Gale, A.J., and Rozenshteyn, D. (2008). Cathepsin G, a leukocyte protease, activates coagulation factor VIII. Thromb. Haemost. *99*, 44–51.

Galligan, L., Livingstone, W., Volkov, Y., Hokamp, K., Murphy, C., Lawler, M., Fukudome, K., and Smith, O. (2001). Characterization of protein C receptor expression in monocytes. Br. J. Haematol. *115*, 408–414.

Gangaraju, R., Kim, S.J., Song, J., Swierczek, S., Thiagarajan, P., and Prchal, J.T. (2016). Upregulation of Thrombo-Inflammatory Pathways May Contribute to Increased Thrombotic Risk in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. Blood *128*, 3143–3143.

Gangat, N., Wassie, E.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A.,

Wolanskyj, A.P., Maffioli, M., Casalone, R., et al. (2014). Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis history. Eur. J. Haematol. *94*, 31–36.

Garcia, R.J., Francis, L., Dawood, M., Lai, Z.-W., Faraone, S.V., and Perl, A. (2013). Brief Report: Attention Deficit and Hyperactivity Disorder Scores Are Elevated and Respond to N-Acetylcysteine Treatment in Patients With Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum. *65*, 1313–1318.

Geddings, J.E., and Mackman, N. (2013). Tumor-derived tissue factor-positive microparticles and venous thrombosis in cancer patients. Blood *122*, 1873–1880.

Gennery, A. (2017). Recent advances in understanding and treating chronic granulomatous disease. F1000Research *6*, 1427.

Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M.L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., and Rafii, S. (2001). Vascular Trauma Induces Rapid but Transient Mobilization of VEGFR2+AC133+ Endothelial Precursor Cells. Circ. Res. *88*, 167–174.

Girodon, F., Dutrillaux, F., Broséus, J., Mounier, M., Goussot, V., Bardonnaud, P., Chrétien, M.L., and Maynadié, M. (2010). Leukocytosis is associated with poor survival but not with increased risk of thrombosis in essential thrombocythemia: a population-based study of 311 patients. Leukemia *24*, 900–903.

GISP (1995). Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia.

Gisslinger, H., Gotic, M., Holowiecki, J., Penka, M., Thiele, J., Kvasnicka, H.-M., Kralovics, R., Petrides, P.E., and for all members of the ANAHYDRET Study Group (2013). Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. Blood *121*, 1720–1728.

Glaser, C.B., Morser, J., Clarke, J.H., Blasko, E., McLean, K., Kuhn, I., Chang, R.J., Lin, J.H., Vilander, L., and Andrews, W.H. (1992). Oxidation of a specific methionine in thrombomodulin by activated neutrophil products blocks cofactor activity. A potential rapid mechanism for modulation of coagulation. J. Clin. Invest. *90*, 2565–2573.

Grant, M.B., May, W.S., Caballero, S., Brown, G.A.J., Guthrie, S.M., Mames, R.N., Byrne, B.J., Vaught, T., Spoerri, P.E., Peck, A.B., et al. (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. Nat. Med. *8*, 607–612.

Griesshammer, M., Saydam, G., Palandri, F., Benevolo, G., Egyed, M., Callum, J., Devos, T., Sivgin, S., Guglielmelli, P., Bensasson, C., et al. (2018). Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythemia vera without splenomegaly: 80-week follow-up from the RESPONSE-2 trial. Ann. Hematol.

Guadall, A., Lesteven, E., Letort, G., Awan Toor, S., Delord, M., Pognant, D., Brusson, M., Verger, E., Maslah, N., Giraudier, S., et al. (2018). Endothelial Cells Harbouring the JAK2V617F Mutation Display Pro-Adherent and Pro-Thrombotic Features. Thromb. Haemost.

Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Bergamaschi, G., Rosti, V., Villani, L., Antonioli, E., Bosi, A.,

Barosi, G., and Vannucchi, A.M. (2007). Anaemia characterises patients with myelofibrosis harbouring MplW515L/K mutation. Br. J. Haematol. *137*, 244–247.

Gunsilius, E., Duba, H.-C., Petzer, A.L., Kahler, C.M., Grunewald, K., Stockhammer, G., Gabl, C., Dirnhofer, S., Clausen, J., and Gastl, G. (2000). Evidence from a leukaemia model for maintenance of vascular endothelium by bone-marrow-derived endothelial cells. The Lancet *355*, 1688–1691.

Gupta, N., Edelmann, B., Schnoeder, T.M., Saalfeld, F.C., Wolleschak, D., Kliche, S., Schraven, B., Heidel, F.H., and Fischer, T. (2017). JAK2-V617F activates β1-integrin-mediated adhesion of granulocytes to vascular cell adhesion molecule 1. Leukemia *31*, 1223–1226.

Guy, A., Gourdou-Latyszenok, V., Le-Lay, N., Peghaire, C., Kilani, B., Dias, J.V., Duplaa, C., Renault, M.-A., Denis, C., Villeval, J.L., et al. (2018). Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. Haematologica haematol.2018.195321.

Haider, M., Gangat, N., Lasho, T., Hussein, A.K.A., Elala, Y.C., Hanson, C., and Tefferi, A. (2016). Validation of the revised international prognostic score of thrombosis for essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis) in 585 Mayo clinic patients. Am. J. Hematol. *91*, 390–394.

Hamilton, K.K., and Sims, P.J. (1987). Changes in cytosolic Ca2+ associated with von Willebrand factor release in human endothelial cells exposed to histamine. Study of microcarrier cell monolayers using the fluorescent probe indo-1. J. Clin. Invest. *79*, 600–608.

Harrison, C.N., Campbell, P.J., Buck, G., Wheatley, K., East, C.L., Bareford, D., Wilkins, B.S., van der Walt, J.D., Reilly, J.T., Grigg, A.P., et al. (2005). Hydroxyurea Compared with Anagrelide in High-Risk Essential Thrombocythemia. N. Engl. J. Med. *353*, 33–45.

Harrison, C.N., Mead, A.J., Panchal, A., Fox, S., Yap, C., Gbandi, E., Houlton, A., Alimam, S., Ewing, J., Wood, M., et al. (2017). Ruxolitinib vs best available therapy for ET intolerant or resistant to hydroxycarbamide. Blood *130*, 1889–1897.

Harrison, M.S.C. Robinson, I.J. Mac, P. (1997). Reticulated platelets. Platelets *8*, 379–384.

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. Blood *122*, 1464–1477.

Haubitz, M., Gerlach, M., Kruse, H.J., and Brunkhorst, R. (2001). Endothelial tissue factor stimulation by proteinase 3 and elastase. Clin. Exp. Immunol. *126*, 584–588.

He, H., Xu, J., Warren, C.M., Duan, D., Li, X., Wu, L., and Iruela-Arispe, M.L. (2012). Endothelial cells provide an instructive niche for the differentiation and functional polarization of M2-like macrophages. Blood *120*, 3152–3162.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N.R., Crystal, R.G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M.A.S., et al. (2002). Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. Cell *109*, 625–637.

Helman, R., Pereira, W. de O., Marti, L.C., Campregher, P.V., Puga, R.D., Hamerschlak, N., Chiattone, C.S., and Santos, F.P. de S. (2016). Granulocyte whole exome sequencing and endothelial JAK2V617F in patients with JAK2V617F positive Budd-Chiari Syndrome without myeloproliferative neoplasm. Br. J. Haematol. *180*, 443–445.

Hemmers, S., Teijaro, J.R., Arandjelovic, S., and Mowen, K.A. (2011). PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity against Influenza Infection. PLoS ONE *6*, e22043.

Herbert, J.M., Savi, P., Laplace, M.C., and Lale, A. (1992). IL-4 inhibits LPS-, IL-1β- and TNFα-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes. FEBS Lett. *310*, 31–33.

Hernandez-Boluda, Magro, E., Cervantes, F., Alvarez-Larrán, A., Gómez, M., Barba, P., Mata, M.-I., González-Porras, J.-R., Ferrer-Marín, F., García-Gutiérrez, V., et al. (2015). Oral anticoagulation to prevent thrombosis recurrence in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Ann. Hematol. *94*, 911–918.

Hildbrand, P., Cirulli, V., Prinsen, R., Smith, K., Torbett, B., Salomon, D., and Crisa, L. (2004). The role of angiopoietins in the development of endothelial cells from cord blood CD34+ progenitors. Blood *104*, 2010–2019.

Hill, J., Zalos, G., Halcox, J., and Schenke, W. (2003). Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. N. Engl. J. Med. 8.

Himber, J., Kling, D., Fallon, J., Nemerson, Y., and Riederer, M. (2002). In situ localization of tissue factor in human thrombi. Blood *99*, 4249–4250.

Hirschi, K.K. (2012). Hemogenic endothelium during development and beyond. Blood *119*, 4823–4827.

Ho, W.K., and Hong, F.S. (2017). CALR exon 9 mutations in idiopathic splanchnic vein thrombosis in an Australian cohort. Thromb. Res. *150*, 51–52.

Hobbs, C.M., Manning, H., Bennett, C., Vasquez, L., Severin, S., Brain, L., Mazharian, A., Guerrero, J.A., Li, J., Soranzo, N., et al. (2013). JAK2V617F leads to intrinsic changes in platelet formation and reactivity in a knock-in mouse model of essential thrombocythemia. Blood *122*, 3787–3797.

Hock, H., Hamblen, M., Rooke, H., Schindler, J., Salleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 997–1002.

Holmgren, L., Bergsmedh, A., and Spetz, A.-L. (2002). Horizontal Transfer of DNA by the Uptake of Apoptotic Bodies. Vox Sang. *83*, 305–306.

Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., Oh, B.-H., Lee, M.-M., and Park, Y.-B. (2004). Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasculogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *24*, 288–293.

Hurtado-Nedelec, M., Csillag-Grange, M.-J., Boussetta, T., Belambri, S.A., Fay, M., Cassinat, B., Gougerot-Pocidalo, M.-A., Dang, P.M.-C., and El-Benna, J. (2013). Increased reactive oxygen species production and p47phox phosphorylation in neutrophils from myeloproliferative disorders patients with JAK2 (V617F) mutation. Haematologica *98*, 1517–1524.

Ianotto, J.-C., Couturier, M.-A., Galinat, H., Mottier, D., Berthou, C., Guillerm, G., Lippert, E., and Delluc, A. (2017). Administration of direct oral anticoagulants in patients with myeloproliferative neoplasms. Int. J. Hematol. *106*, 517–521.

Ingram, D.A., Mead, L., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., and Yoder, M.C. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. Blood *104*, 2752–2760.

Ingram, D.A., Mead, L., Moore, D., Woodard, W., Fenoglio, A., and Yoder, M.C. (2005a). Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. Blood *105*, 2783–2786.

Ingram, D.A., Caplice, N., and Yoder, M.C. (2005b). Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. Blood *106*, 1525–1531.

Itagaki, K., Kaczmarek, E., Lee, Y.T., Tang, I.T., Isal, B., Adibnia, Y., Sandler, N., Grimm, M.J., Segal, B.H., Otterbein, L.E., et al. (2015). Mitochondrial DNA Released by Trauma Induces Neutrophil Extracellular Traps. PLOS ONE *10*, e0120549.

Ito, T., Kawahara, K., Nakamura, T., Yamada, S., Nakamura, T., Abeyama, K., Hashiguchi, T., and Maruyama, I. (2006). High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. J. Thromb. Haemost. *5*, 109–116.

Iurlo, A., Cattaneo, D., Gianelli, U., Fermo, E., Augello, C., and Cortelezzi, A. (2015). Molecular analyses in the diagnosis of myeloproliferative neoplasm-related splanchnic vein thrombosis. Ann. Hematol. *94*, 881–882.

Jackson, K.A., Majka, S.M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Michael, L.H., Hirschi, K.K., and Goodell, M.A. (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J. Clin. Invest. *107*, 1395–1402.

Jadli, A., Kulkarni, B., Ghosh, K., and Shetty, S. (2012). Non conventional mutations associated with myeloproliferative disorders are absent in splanchnic venous thrombosis cases. Liver Int. *32*, 1596–1597.

Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.-D., and Knippers, R. (2001). DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. Cancer Res. 8.

James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., and Vainchenker, W. (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature *434*, 5.

Jensen, M.K., Brown, P.D.N., Lund, B.V., Nielsen, O.J., and Hasselbalch, H.C. (2000).

Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and redistribution in myeloproliferative disorders. Br. J. Haematol. *110*, 116–124.

Jensen, M.K., Brown, P. de N., Thorsen, S., and Hasselbalch, H.C. (2002). Frequent occurrence of anticardiolipin antibodies, Factor V Leiden mutation, and perturbed endothelial function in chronic myeloproliferative disorders. Am. J. Hematol. *69*, 185–191.

Jiang, S., Walker, L., Afentoulis, M., Anderson, D.A., Jauron-Mills, L., Corless, C.L., and Fleming, W.H. (2004). Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *101*, 16891–16896.

Jiménez-Alcázar, M., Limacher, A., Panda, R., Méan, M., Bitterling, J., Peine, S., Renné, T., Beer, J.H., Aujesky, D., Lämmle, B., et al. (2018). Circulating extracellular DNA is an independent predictor of mortality in elderly patients with venous thromboembolism. PLOS ONE *13*, e0191150.

Jorch, S.K., and Kubes, P. (2017). An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease. Nat. Med. *23*, 279–287.

Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., Masaki, H., Mori, Y., Iba, O., Tateishi, E., et al. (2001). Implantation of Bone Marrow Mononuclear Cells Into Ischemic Myocardium Enhances Collateral Perfusion and Regional Function via Side Supply of Angioblasts, Angiogenic Ligands, and Cytokines. Circulation *104*, 1046–1052.

Kannemeier, C., Shibamiya, A., Nakazawa, F., Trusheim, H., Ruppert, C., Markart, P., Song, Y., Tzima, E., Kennerknecht, E., Niepmann, M., et al. (2007). Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. Proc. Natl. Acad. Sci. *104*, 6388–6393.

Kaplar, M., Kappelmayer, J., Kiss, A., Szabo, K., and Udvardy, M. (2000). Increased leukocyte-platelet adhesion in chronic myeloproliferative disorders with high platelet counts. Platelets *11*, 183–184.

Karlsson, A., and Dahlgren, C. (2002). Assembly and Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase in Granule Membranes. Antioxid. Redox Signal. *4*, 49–60.

Kawamoto, A., Gwon, H.-C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J.-I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J.M., et al. (2001). Therapeutic Potential of Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cells for Myocardial Ischemia. Circulation *103*, 634–637.

Kessenbrock, K., Krumbholz, M., Schönermarck, U., Back, W., Gross, W.L., Werb, Z., Gröne, H.-J., Brinkmann, V., and Jenne, D.E. (2009). Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. Nat. Med. *15*, 623–625.

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-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. Blood *112*, 3065–3072.

Kiladjian, J.-J., Chevret, S., Dosquet, C., Chomienne, C., and Rain, J.-D. (2011). Treatment of Polycythemia Vera With Hydroxyurea and Pipobroman: Final Results of a Randomized Trial Initiated in 1980. J. Clin. Oncol. *29*, 3907–3913.

Kilani, B., Dias, J.V., Gourdou-Latyszenok, V., Lippert, E., Sewduth, R., Duplaa, C., Villeval, J.-L., Couffinhal, T., and James, C. (2014). Consequences of the Presence of the JAK2V617F Mutation in Endothelial Cells: Towards a Better Understanding of the Increased Angiogenesis in Myeloproliferative Neoplasms. Blood *124*, 102–102.

Kim, K.-J., Kwon, S.-H., Yun, J.-H., Jeong, H.-S., Kim, H.-R., Lee, E.H., Ye, S.-K., and Cho, C.-H. (2017). STAT3 activation in endothelial cells is important for tumor metastasis via increased cell adhesion molecule expression. Oncogene *36*, 5445–5459.

Kinder, S., Tsang, T.E., Quinlan, G.A., Hadjantonakis, A.-K., Nagy, A., and Tam, P. (1999). Fate of primitive streak cells. Development 11.

Kirito, K., Sakamoto, M., and Enomoto, N. (2016). Elevation of the Hepatitis B Virus DNA during the Treatment of Polycythemia Vera with the JAK Kinase Inhibitor Ruxolitinib. Intern. Med. Tokyo Jpn. *55*, 1341–1344.

Kissa, K., and Herbomel, P. (2010). Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. Nature *464*, 112–115.

Kissova, J., Ovesna, P., Bulikova, A., Zavřelova, J., and Penka, M. (2015). Increasing procoagulant activity of circulating microparticles in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: a single-centre experience. Blood Coagul. Fibrinolysis *26*, 448–453.

Kittur, J., Knudson, R.A., Lasho, T.L., Finke, C.M., Gangat, N., Wolanskyj, A.P., Li, C.-Y., Wu, W., Ketterling, R.P., Pardanani, A., et al. (2007). Clinical correlates of JAK2V617F allele burden in essential thrombocythemia. Cancer *109*, 2279–2284.

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

Knight, J.S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O'Dell, A.A., Yalavarthi, S., Hodgin, J.B., Eitzman, D.T., Thompson, P.R., and Kaplan, M.J. (2013). Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. J. Clin. Invest. *123*, 2981–2993.

Knight, J.S., Luo, W., O'Dell, A.A., Yalavarthi, S., Zhao, W., Subramanian, V., Guo, C., Grenn, R.C., Thompson, P.R., Eitzman, D.T., et al. (2014). Peptidylarginine Deiminase Inhibition Reduces Vascular Damage and Modulates Innate Immune Responses in Murine Models of Atherosclerosis. Circ. Res. *114*, 947–956.

Knight, J.S., Subramanian, V., O'Dell, A.A., Yalavarthi, S., Zhao, W., Smith, C.K., Hodgin, J.B., Thompson, P.R., and Kaplan, M.J. (2015). Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/ *lpr* mice. Ann. Rheum. Dis. *74*, 2199–2206.

Kogan, I., Chap, D., Hoffman, R., Axelman, E., Brenner, B., and Nadir, Y. (2016). JAK-2 V617F mutation increases heparanase procoagulant activity. Thromb. Haemost. *115*, 73–80.

Kolaczkowska, E., Jenne, C.N., Surewaard, B.G.J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-

J., Mowen, K., Opdenakker, G., and Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. Nat. Commun. *6*.

Kollet, O., Spiegel, A., Peled, A., Petit, I., Byk, T., Hershkoviz, R., Guetta, E., Barkai, G., Nagler, A., and Lapidot, T. (2001). Rapid and efficient homing of human CD34ƈCD38ƛ/lowCXCR4ƈ stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice. Blood *97*, 10.

Koren-Michowitz, M., Landman, J., Cohen, Y., Rahimi-Levene, N., Salomon, O., Michael, M., Amariglio, N., and Nagler, A. (2012). JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis. Leuk. Lymphoma *53*, 2210–2213.

Kornberg, A., Rahimi-Levene, N., Yona, R., Mor, A., and Rachmilewitz, E.A. (1997). Enhanced generation of monocyte tissue factor and increased plasma prothrombin fragment1+2 levels in patients with polycythemia vera: Mechanism of activation of blood coagulation. Am. J. Hematol. *56*, 5–11.

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R.C. (2005). A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. N. Engl. J. Med. *352*, 1779–1790.

Kuriakose, E.T., Gjoni, S., Wang, Y.L., Baumann, R., Jones, A.V., Cross, N.C.P., and Silver, R.T. (2013). JAK2V617F allele burden is reduced by busulfan therapy: a new observation using an old drug. Haematologica *98*, e135–e137.

Lacout, C., Pisani, D., Tulliez, M., Moreau Gachelin, F., Vainchenker, W., and Villeval, J.L. (2006). JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood *108*, 1652–1660.

Lai, Z.-W., Hanczko, R., Bonilla, E., Caza, T.N., Clair, B., Bartos, A., Miklossy, G., Jimah, J., Doherty, E., Tily, H., et al. (2012). N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum. *64*, 2937–2946.

Lamrani, L., Lacout, C., Ollivier, V., Denis, C.V., Gardiner, E., Ho Tin Noe, B., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., and Jandrot-Perrus, M. (2014). Hemostatic disorders in a JAK2V617F-driven mouse model of myeloproliferative neoplasm. Blood *124*, 1136–1145.

Lancellotti, S., Dragani, A., Ranalli, P., Petrucci, G., Basso, M., Tartaglione, R., Rocca, B., and Cristofaro, R.D. (2015). Qualitative and quantitative modifications of von Willebrand factor in patients with essential thrombocythemia and controlled platelet count. J. Thromb. Haemost. *13*, 1226–1237.

Lancrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., and Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. Nature *457*, 892–895.

Lancrin, C., Mazan, M., Stefanska, M., Patel, R., Lichtinger, M., Costa, G., Vargel, O., Wilson, N.K., Moroy, T., Bonifer, C., et al. (2012). GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. Blood *120*, 314–322.

Landolfi, R., Ciabattoni, G., Patrignani, P., Bizzi, B., and Patrono, C. (1992). Increased Thromboxane Biosynthesis in Patients With Polycythemia Vera: Evidence for Aspirin-Suppressible Platelet Activation In Vivo. Blood 8.

Landolfi, R., Rocca, B., and Patrono, C. (1995). Bleeding and thrombosis in myeloproliferative disorders: mechanisms and treatment. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *20*, 203–222.

Landolfi, R., Roberto, M., Jack, K., Heinz, G., Gianni, T., Carlo, P., and Tiziano, B. (2004). Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. N. Engl. J. Med. 11.

Landolfi, R., Di Gennaro, L., Barbui, T., De Stefano, V., Finazzi, G., Marfisi, R., Tognoni, G., Marchioli, R., and for the European Collaboration on Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP) (2007). Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. Blood *109*, 2446–2452.

Lapponi, M.J., Carestia, A., Landoni, V.I., Rivadeneyra, L., Etulain, J., Negrotto, S., Pozner, R.G., and Schattner, M. (2013). Regulation of Neutrophil Extracellular Trap Formation by Anti-Inflammatory Drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. *345*, 430–437.

Laufs, U., Werner, N., Link, A., Endres, M., Wassmann, S., Jürgens, K., Miche, E., Böhm, M., and Nickenig, G. (2004). Physical Training Increases Endothelial Progenitor Cells, Inhibits Neointima Formation, and Enhances Angiogenesis. Circulation *109*, 220–226.

Lee, S.H., Wolf, P.L., Escudero, R., Deutsch, R., Jamieson, S.W., and Thistlethwaite, P.A. (2000). Early Expression of Angiogenesis Factors in Acute Myocardial Ischemia and Infarction. N. Engl. J. Med. *342*, 626–633.

Lee, Y., EL Andaloussi, S., and Wood, M.J.A. (2012). Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy. Hum. Mol. Genet. *21*, R125–R134.

Lefrançais, E., Ortiz-Muñoz, G., Caudrillier, A., Mallavia, B., Liu, F., Sayah, D.M., Thornton, E.E., Headley, M.B., David, T., Coughlin, S.R., et al. (2017). The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. Nature *544*, 105–109.

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

Lewis, H.D., Liddle, J., Coote, J.E., Atkinson, S.J., Barker, M.D., Bax, B.D., Bicker, K.L., Bingham, R.P., Campbell, M., Chen, Y.H., et al. (2015). Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. Nat. Chem. Biol. *11*, 189–191.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. *7*, 678–689.

Li, J., Kent, D.G., Godfrey, A.L., Manning, H., Nangalia, J., Aziz, A., Chen, E., Saeb-Parsy, K., Fink, J., Sneade, R., et al. (2014). JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. Blood *123*, 3139–3151.

Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., and Wang, Y. (2010). PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. J. Exp. Med. *207*, 1853–1862.

Lin, C.H.S., Kaushansky, K., and Zhan, H. (2016). JAK2V617F-mutant vascular niche contributes to JAK2V617F clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. Blood Cells. Mol. Dis. *62*, 42–48.

Lin, C.H.S., Zhang, Y., Kaushansky, K., and Zhan, H. (2018). *JAK2V617F* -bearing vascular niche enhances malignant hematopoietic regeneration following radiation injury. Haematologica *103*, 1160–1168.

Lin, Y., Weisdorf, D.J., Solovey, A., and Hebbel, R.P. (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. J. Clin. Invest. *105*, 71–77.

Lindauer, K., Loerting, T., Liedl, K.R., and Kroemer, R.T. (2001). 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.

Lu, X., Huang, L.J.-S., and Lodish, H.F. (2008). Dimerization by a Cytokine Receptor Is Necessary for Constitutive Activation of JAK2V617F. J. Biol. Chem. *283*, 5258–5266.

Lundberg, P., Karow, A., Nienhold, R., Looser, R., Hao-Shen, H., Nissen, I., Girsberger, S., Lehmann, T., Passweg, J., Stern, M., et al. (2014). Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood *123*, 2220–2228.

Lussana, F., Caberlon, S., Pagani, C., Kamphuisen, P.W., Büller, H.R., and Cattaneo, M. (2009). Association of V617F Jak2 mutation with the risk of thrombosis among patients with essential thrombocythaemia or idiopathic myelofibrosis: A systematic review. Thromb. Res. *124*, 409–417.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow–derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat. Med. *7*, 1194–1201.

Maeng, Y.-S., Choi, H.-J., Kwon, J.-Y., Park, Y.-W., Choi, K.-S., Min, J.-K., Kim, Y.-H., Suh, P.-G., Kang, K.-S., Won, M.-H., et al. (2009). Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLC 2 axis. Blood *113*, 233–243.

Maicas, N., Ferrándiz, M.L., Brines, R., Ibáñez, L., Cuadrado, A., Koenders, M.I., van den Berg, W.B., and Alcaraz, M.J. (2011). Deficiency of Nrf2 Accelerates the Effector Phase of Arthritis and Aggravates Joint Disease. Antioxid. Redox Signal. *15*, 889–901.

Malachowa, N., Kobayashi, S.D., Freedman, B., Dorward, D.W., and DeLeo, F.R. (2013). Staphylococcus aureus Leukotoxin GH Promotes Formation of Neutrophil Extracellular Traps. J. Immunol. *191*, 6022–6029.

Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Lesèche, G., Freyssinet, J.-M., and Tedgui, A. (1999). Shed Membrane Microparticles With Procoagulant Potential in Human Atherosclerotic Plaques: A Role for Apoptosis in Plaque Thrombogenicity. Circulation *99*, 348–353.

Manavski, Y., Lucas, T., Glaser, S.F., Dorsheimer, L., Günther, S., Braun, T., Rieger, M.A., Zeiher, A.M., Boon, R.A., and Dimmeler, S. (2018). Clonal Expansion of Endothelial Cells Contributes to Ischemia-Induced NeovascularizationNovelty and Significance. Circ. Res. *122*, 670–677.

Marchetti, M., Castoldi, E., Spronk, H.M.H., van Oerle, R., Balducci, D., Barbui, T., Rosing, J., ten Cate, H., and Falanga, A. (2008). Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood *112*, 4061–4068.

Marchetti, M., Tartari, C.J., Russo, L., Panova-Noeva, M., Leuzzi, A., Rambaldi, A., Finazzi, G., Woodhams, B., and Falanga, A. (2014). Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with Essential Thrombocythemia. Am. J. Hematol. *89*, 68–73.

Marchioli, R., Finazzi, G., Specchia, G., Cacciola, R., Cavazzina, R., Cilloni, D., De Stefano, V., Elli, E., Iurlo, A., Latagliata, R., et al. (2013). Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera. N. Engl. J. Med. *368*, 22–33.

Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. Front. Biosci. J. Virtual Libr. *13*, 453–461.

Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T.A., Wong, S.L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., and Wagner, D.D. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 8674–8679.

Martinod, K., Fuchs, T.A., Zitomersky, N.L., Wong, S.L., Demers, M., Gallant, M., Wang, Y., and Wagner, D.D. (2015). PAD4-deficiency does not affect bacteremia in polymicrobial sepsis and ameliorates endotoxemic shock. Blood *125*, 1948–1956.

Martinod, K., Witsch, T., Farley, K., Gallant, M., Remold-O'Donnell, E., and Wagner, D.D. (2016). Neutrophil elastase-deficient mice form neutrophil extracellular traps in an experimental model of deep vein thrombosis. J. Thromb. Haemost. *14*, 551–558.

Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.-C., Vainchenker, W., and Villeval, J.-L. (2010). Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. Blood *116*, 783–787.

Marty, C., Lacout, C., Droin, N., Le Couédic, J.-P., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., and Plo, I. (2013). A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. Leukemia *27*, 2187–2195.

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.

Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.-L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., et al. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. Nat. Med. *16*, 887–896.

Maugeri, N., Brambilla, M., Camera, M., Carbone, A., Tremoli, E., Donati, M.B., Gaetano, G.D., and Cerletti, C. (2006). Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation1. J. Thromb. Haemost. *4*, 1323–1330.

Mauracher, L.-M., Posch, F., Martinod, K., Grilz, E., Däullary, T., Hell, L., Brostjan, C., Zielinski, C., Ay, C., Wagner, D.D., et al. (2018). Citrullinated histone H3, a biomarker of neutrophil extracellular trap formation, predicts the risk of venous thromboembolism in cancer patients. J. Thromb. Haemost. *16*, 508–518.

Mazzucconi, M.G., Redi, R., Bernasconi, S., Bizzoni, L., Dragoni, F., Latagliata, R., Santoro, C., and Mandelli, F. (2004). A long-term study of young patients with essential thrombocythemia treated with anagrelide. Haematologica 8.

McCachren, S.S., Diggs, J., Weinberg, J.B., and Dittman, W.A. (1991). Thrombomodulin Expression by Human Blood Monocytes and by Human Synovial Tissue Lining Macrophages. Blood 6.

McGee, M., Foster, S., and Wang, X. (1994). Simultaneous expression of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor by human monocytes. A potential mechanism for localized control of blood coagulation. J. Exp. Med. *179*, 1847–1854.

McIlroy, D.J., Jarnicki, A.G., Au, G.G., Lott, N., Smith, D.W., Hansbro, P.M., and Balogh, Z.J. (2014). Mitochondrial DNA neutrophil extracellular traps are formed after trauma and subsequent surgery. J. Crit. Care *29*, 1133.e1-1133.e5.

Medvinsky, A., and Dzierzak, E. (1996). Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. Cell *86*, 897–906.

Megens, R.T.A., Vijayan, S., Lievens, D., Döring, Y., van Zandvoort, M.A.M.J., Grommes, J., Weber, C., and Soehnlein, O. (2012). Presence of luminal neutrophil extracellular traps in atherosclerosis. Thromb. Haemost. *107*, 597–598.

Melero-Martin, J.M., Khan, Z.A., Picard, A., Wu, X., Paruchuri, S., and Bischoff, J. (2007). In vivo vasculogenic potential of human blood-derived endothelial progenitor cells. Blood *109*, 4761–4768.

Melero-Martin, J.M., Obaldia, M.E.D., Kang, S.-Y., Khan, Z.A., Yuan, L., Oettgen, P., and Bischoff, J. (2008). Engineering Robust and Functional Vascular Networks In Vivo With Human Adult and Cord Blood–Derived Progenitor Cells. Circ. Res. *103*, 194–202.

Meng, H., Yalavarthi, S., Kanthi, Y., Mazza, L.F., Elfline, M.A., Luke, C.E., Pinsky, D.J., Henke, P.K., and Knight, J.S. (2017). In Vivo Role of Neutrophil Extracellular Traps in Antiphospholipid Antibody–Mediated Venous Thrombosis. Arthritis Rheumatol. *69*, 655–667.

Messinezy, M., Pearson, T.C., Prochazka, A., and Wetherley-Mein, G. (1985). Treatment of primary proliferative polycythaemia by venesection and low dose busulphan: retrospective study from one centre. Br. J. Haematol. *61*, 657–666.

Metzler, K.D., Fuchs, T.A., Nauseef, W.M., Reumaux, D., Roesler, J., Schulze, I., Wahn, V., Papayannopoulos, V., and Zychlinsky, A. (2011). Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. Blood *117*, 953–959.

Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., and Papayannopoulos, V. (2014). A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics during NETosis. Cell Rep. *8*, 883–896.

Michels, A., Swystun, L.L., Albanez, S., Mewburn, J., Sponagle, K., and Lillicrap, D. (2014). Histones Induce Endothelial Von Willebrand Factor Release and Subsequent Platelet Capture in In Vitro and In Vivo Models | Blood Journal.

Misawa, K., Yasuda, H., Araki, M., Ochiai, T., Morishita, S., Nudejima, M., Hironaka, Y., Shirane, S., Edahiro, Y., Gotoh, A., et al. (2017). The 2016 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera renders an accurate diagnosis to a broader range of patients including masked polycythemia vera: Comparison with the 2008 WHO diagnostic criteria. Am. J. Hematol. *92*, E128–E130.

Mitroulis, I., Kambas, K., Chrysanthopoulou, A., Skendros, P., Apostolidou, E., Kourtzelis, I., Drosos, G.I., Boumpas, D.T., and Ritis, K. (2011). Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Associated with IL-1β and Autophagy-Related Signaling in Gout. PLoS ONE *6*, e29318.

Montanaro, M., Latagliata, R., Cedrone, M., Spadea, A., Rago, A., Giandomenico, J.D., Spirito, F., Porrini, R., Muro, M.D., Leonetti, S.C., et al. (2014). Thrombosis and survival in essential thrombocythemia: A regional study of 1,144 patients. Am. J. Hematol. *89*, 542–546.

Montfoort, M.L. van, Stephan, F., Lauw, M.N., Hutten, B.A., Mierlo, G.J.V., Solati, S., Middeldorp, S., Meijers, J.C.M., and Zeerleder, S. (2013). Circulating Nucleosomes and Neutrophil Activation as Risk Factors for Deep Vein Thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *33*, 147–151.

Moosbauer, C., Morgenstern, E., Cuvelier, S.L., Manukyan, D., Bidzhekov, K., Albrecht, S., Lohse, P., Patel, K.D., and Engelmann, B. (2006). Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. Blood *109*, 995–1002.

Morshed, M., Hlushchuk, R., Simon, D., Walls, A.F., Obata-Ninomiya, K., Karasuyama, H., Djonov, V., Eggel, A., Kaufmann, T., Simon, H.-U., et al. (2014). NADPH Oxidase-Independent Formation of Extracellular DNA Traps by Basophils. J. Immunol. *192*, 5314–5323.

Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K., and Imaizumi, T. (2000). Transplanted cord blood–derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. J. Clin. Invest. *105*, 1527–1536.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. Genesis *45*, 593–605.

Myers, D.D., Rectenwald, J.E., Bedard, P.W., Kaila, N., Shaw, G.D., Schaub, R.G., Farris, D.M., Hawley, A.E., Wrobleski, S.K., Henke, P.K., et al. (2005). Decreased venous thrombosis with an oral inhibitor of P selectin. J. Vasc. Surg. *42*, 329–336.

Nadin, B.M., Goodell, M.A., and Hirschi, K.K. (2003). Phenotype and hematopoietic potential of side population cells throughout embryonic development. Blood *102*, 2436–2443.

Nadir, Y., Brenner, B., Zetser, A., Ilan, N., Shafat, I., Zcharia, E., Goldshmidt, O., and

Vlodavsky, I. (2006). Heparanase induces tissue factor expression in vascular endothelial and cancer cells. J. Thromb. Haemost. *4*, 2443–2451.

Nadir, Y., Brenner, B., Gingis-Velitski, S., Levy-Adam, F., Ilan, N., Zcharia, E., Nadir, E., and Vlodavsky, I. (2008). Heparanase induces tissue factor pathway inhibitor expression and extracellular accumulation in endothelial and tumor cells. Thromb. Haemost. *99*, 133–141.

Nadir, Y., Brenner, B., Fux, L., Shafat, I., Attias, J., and Vlodavsky, I. (2010). Heparanase enhances the generation of activated factor X in the presence of tissue factor and activated factor VII. Haematologica *95*, 1927–1934.

Naito, H., Kidoya, H., Sakimoto, S., Wakabayashi, T., and Takakura, N. (2012). Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. EMBO J. *31*, 842–855.

Najean, Y., and Rain, J.-D. (1997). Treatment of Polycythemia Vera: The Use of Hydroxyurea and Pipobroman in 292 Patients Under the Age of 65 Years. Blood 9.

Nakamura, S., Imamura, T., and Okamoto, K. (2004). Tissue factor in neutrophils: yes. J. Thromb. Haemost. *2*, 214–217.

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

Napirei, M., Ludwig, S., Mezrhab, J., Klöckl, T., and Mannherz, H.G. (2009). Murine serum nucleases – contrasting effects of plasmin and heparin on the activities of DNase1 and DNase1-like 3 (DNase1l3). FEBS J. *276*, 1059–1073.

Nesheim, M.E., Taswell, J.B., and Mann, K.G. (1979). The contribution of bovine Factor V and Factor Va to the activity of prothrombinase. J. Biol. Chem. *254*, 10952–10962.

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

Oppliger Leibundgut, E., Horn, M.P., Brunold, C., Pfanner-Meyer, B., Marti, D., Hirsiger, H., Tobler, A., and Zwicky, C. (2006). Hematopoietic and endothelial progenitor cell trafficking in patients with myeloproliferative diseases. Haematologica 8.

Orfeo, T., Brufatto, N., Nesheim, M.E., Xu, H., Butenas, S., and Mann, K.G. (2004). The Factor V Activation Paradox. J. Biol. Chem. *279*, 19580–19591.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Limana, F., Jakoniuk, I., Quaini, F., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A., and Anversa, P. (2001). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. Proc. Natl. Acad. Sci. *98*, 10344–10349.

Oyarzún, C.P., Carestia, A., Lev, P.R., Glembotsky, A.C., Castro Ríos, M.A., Moiraghi, B., Molinas, F.C., Marta, R.F., Schattner, M., and Heller, P.G. (2016). Neutrophil extracellular trap formation and circulating nucleosomes in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. Sci. Rep. *6*.

Palandri, F., Catani, L., Testoni, N., Ottaviani, E., Polverelli, N., Fiacchini, M., Vivo, A.D., Salmi, F., Lucchesi, A., Baccarani, M., et al. (2008). Long-term follow-up of 386 consecutive patients with essential thrombocythemia: Safety of cytoreductive therapy. Am. J. Hematol. *84*, 215–220.

Palandri, F., Polverelli, N., Catani, L., Ottaviani, E., Baccarani, M., and Vianelli, N. (2011). Impact of leukocytosis on thrombotic risk and survival in 532 patients with essential thrombocythemia: a retrospective study. Ann. Hematol. *90*, 933–938.

Palandri, F., Latagliata, R., Polverelli, N., Tieghi, A., Crugnola, M., Martino, B., Perricone, M., Breccia, M., Ottaviani, E., Testoni, N., et al. (2015). Mutations and long-term outcome of 217 young patients with essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis. Leukemia *29*, 1344–1349.

Panova-Noeva, M., Marchetti, M., Spronk, H.M., Russo, L., Diani, E., Finazzi, G., Salmoiraghi, S., Rambaldi, A., Barbui, T., Cate, H.T., et al. (2011). Platelet-induced thrombin generation by the calibrated automated thrombogram assay is increased in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Am. J. Hematol. *86*, 337–342.

Panova-Noeva, M., Marchetti, M., Buoro, S., Russo, L., Leuzzi, A., Finazzi, G., Rambaldi, A., Ottomano, C., ten Cate, H., and Falanga, A. (2011). JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinants of immature platelet parameters in essential thrombocythemia and polycythemia vera patients. Blood *118*, 2599–2601.

Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. *191*, 677–691.

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

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

Pareti, F.I., Gugliotta, L., Mannucci, L., Guarini, A., and Mannucci, P.M. (1982). Biochemical and metabolic aspects of platelet dysfunction in chronic myeloproliferative disorders. Thromb. Haemost. *47*, 84–89.

Pascale, S., Petrucci, G., Dragani, A., Habib, A., Zaccardi, F., Pagliaccia, F., Pocaterra, D., Ragazzoni, E., Rolandi, G., Rocca, B., et al. (2012). Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. Blood *119*, 3595–3603.

Passamonti, F., Rumi, E., Arcaini, L., Boveri, E., Elena, C., Pietra, D., Boggi, S., Astori, C., Bernasconi, P., Varettoni, M., et al. (2008). Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. Haematologica *93*, 1645–1651.

Passamonti, F., Rumi, E., Pascutto, C., Cazzola, M., and Lazzarino, M. (2009). Increase in

leukocyte count over time predicts thrombosis in patients with low-risk essential thrombocythemia. J. Thromb. Haemost. *7*, 1587–1589.

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

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

Passamonti, F., Griesshammer, M., Palandri, F., Egyed, M., Benevolo, G., Devos, T., Callum, J., Vannucchi, A.M., Sivgin, S., Bensasson, C., et al. (2017). Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. Lancet Oncol. *18*, 88–99.

Passamonti, S.M., Biguzzi, E., Cazzola, M., Franchi, F., Gianniello, F., Bucciarelli, P., Pietra, D., Mannucci, P.M., and Martinelli, I. (2012). The JAK2 V617F mutation in patients with cerebral venous thrombosis. J. Thromb. Haemost. *10*, 998–1003.

Passegué, E., Wagner, E.F., and Weissman, I.L. (2004). JunB Deficiency Leads to a Myeloproliferative Disorder Arising from Hematopoietic Stem Cells. Cell *119*, 431–443.

Patrono, C., Rocca, B., and De Stefano, V. (2013). Platelet activation and inhibition in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Blood *121*, 1701–1711.

Pearson, T. (1997). Hemorheologic Considerations in the Pathogenesis of Vascular Occlusive Events in Polycythemia Vera. Semin. Thromb. Hemost. *23*, 433–439.

Pearson, T.C., and Wetherley-Mein, G. (1978). Vascular occlusive episodes and venous haematocrit in primary proliferative polycythaemia. The Lancet *312*, 1219–1222.

Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A.S., et al. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34♀ cells identifies a population of functional endothelial precursors. Blood *95*, 8.

Peled, A., Grabovsky, V., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Petit, I., Ben-Hur, H., Lapidot, T., and Alon, R. (1999). The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34+ cells on vascular endothelium under shear flow. J. Clin. Invest. *104*, 1199–1211.

Pelosi, E., Valtieri, M., Coppola, S., Botta, R., Gabbinelli, M., Lulli, V., Marziali, G., Masella, B., Muller, R., Sgadari, C., et al. (2002). Identification of the hemangioblast in postnatal life. Blood *100*, 3203–3208.

Pendu, R., Terraube, V., Christophe, O.D., Gahmberg, C.G., de Groot, P.G., Lenting, P.J., and Denis, C.V. (2006). P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. Blood *108*, 3746–3752.

Piaggio, G., Rosti, V., Corselli, M., Bertolotti, F., Bergamaschi, G., Pozzi, S., Imperiale, D., Chiavarina, B., Bonetti, E., Novara, F., et al. (2009). Endothelial colony-forming cells from

patients with chronic myeloproliferative disorders lack the disease-specific molecular clonality marker. Blood *114*, 3127–3130.

Piccin, A., Steurer, M., Feistritzer, C., Murphy, C., Eakins, E., Van Schilfgaarde, M., Corvetta, D., Di Pierro, A.M., Pusceddu, I., Marcheselli, L., et al. (2017). Observational retrospective study of vascular modulator changes during treatment in essential thrombocythemia. Transl. Res. *184*, 21–34.

Pich, A., Riera, L., Beggiato, E., Nicolino, B., Godio, L., Campisi, P., Sismondi, F., and di Celle, P.F. (2012). JAK2V617F mutation and allele burden are associated with distinct clinical and morphological subtypes in patients with essential thrombocythaemia. J. Clin. Pathol. *65*, 953–955.

Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., et al. (2006). MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. PLoS Med. *3*, e270.

Pillarisetti, K., and Gupta, S.K. (2001). Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. Inflammation *25*, 293–300.

Pilsczek, F.H., Salina, D., Poon, K.K.H., Fahey, C., Yipp, B.G., Sibley, C.D., Robbins, S.M., Green, F.H.Y., Surette, M.G., Sugai, M., et al. (2010). A Novel Mechanism of Rapid Nuclear Neutrophil Extracellular Trap Formation in Response to Staphylococcus aureus. J. Immunol. *185*, 7413–7425.

Pinsky, D.J., Naka, Y., Liao, H., Oz, M.C., Wagner, D.D., Mayadas, T.N., Johnson, R.C., Hynes, R.O., Heath, M., Lawson, C.A., et al. (1996). Hypoxia-induced exocytosis of endothelial cell Weibel-Palade bodies. A mechanism for rapid neutrophil recruitment after cardiac preservation. J. Clin. Invest. *97*, 493–500.

Plescia, J., and Altieri, D.C. (1996). Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation. Biochem. J. *319*, 873–879.

Poisson, J., Plessier, A., Kiladjian, J.-J., Turon, F., Cassinat, B., Andreoli, A., De Raucourt, E., Goria, O., Zekrini, K., Bureau, C., et al. (2017). Selective testing for calreticulin gene mutations in patients with splanchnic vein thrombosis: A prospective cohort study. J. Hepatol. *67*, 501–507.

Policitemia (gisp) (1997). Low-dose aspirin in polycythaemia vera: a pilot study. Br. J. Haematol. *97*, 453–456.

Preston, F.E., Emmanuel, I.G., Winfield, D.A., and Malia, R.G. (1974). Essential Thrombocythaemia and Peripheral Gangrene. Br. Med. J. *3*, 548–552.

Prins, M.H., Lensing, A.W.A., Brighton, T.A., Lyons, R.M., Rehm, J., Trajanovic, M., Davidson, B.L., Beyer-Westendorf, J., Pap, Á.F., Berkowitz, S.D., et al. (2014). Oral rivaroxaban versus enoxaparin with vitamin K antagonist for the treatment of symptomatic venous thromboembolism in patients with cancer (EINSTEIN-DVT and EINSTEIN-PE): a pooled subgroup analysis of two randomised controlled trials. Lancet Haematol. *1*, e37–e46.

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 a-2a. Blood *122*, 10.

Raskob, G.E., van Es, N., Verhamme, P., Carrier, M., Di Nisio, M., Garcia, D., Grosso, M.A., Kakkar, A.K., Kovacs, M.J., Mercuri, M.F., et al. (2018). Edoxaban for the Treatment of Cancer-Associated Venous Thromboembolism. N. Engl. J. Med. *378*, 615–624.

Regev, A., Stark, P., Blickstein, D., and Lahav, M. (1997). Thrombotic complications in essential thrombocythemia with relatively low platelet counts. Am. J. Hematol. *56*, 168–172.

Rigolin, G.M., Fraulini, C., Ciccone, M., Mauro, E., Bugli, A.M., De Angeli, C., Negrini, M., Cuneo, A., and Castoldi (2006). Neoplastic circulating endothelial cells in multiple myeloma with 13q14 deletion. Blood *107*, 2531–2535.

Rochael, N.C., Guimarães-Costa, A.B., Nascimento, M.T.C., DeSouza-Vieira, T.S., Oliveira, M.P., Garcia e Souza, L.F., Oliveira, M.F., and Saraiva, E.M. (2016). Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. Sci. Rep. *5*.

Rossaint, J., Herter, J.M., Van Aken, H., Napirei, M., Doring, Y., Weber, C., Soehnlein, O., and Zarbock, A. (2014). Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation. Blood *123*, 2573–2584.

Rössig, L., Urbich, C., Brühl, T., Dernbach, E., Heeschen, C., Chavakis, E., Sasaki, K., Aicher, D., Diehl, F., Seeger, F., et al. (2005). Histone deacetylase activity is essential for the expression of *HoxA9* and for endothelial commitment of progenitor cells. J. Exp. Med. *201*, 1825–1835.

Rosti, V., Villani, L., Riboni, R., Poletto, V., Bonetti, E., Tozzi, L., Bergamaschi, G., Catarsi, P., Dallera, E., Novara, F., et al. (2013). Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. Blood *121*, 360–368.

Rotunno, G., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., Pacilli, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Fanelli, T., Bosi, A., Vannucchi, A.M., and on behalf of the Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators (2014). Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. Blood *123*, 1552–1555.

Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Elena, C., Casetti, I.C., et al. (2014). JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. Blood *123*, 1544–1551.

Russell, N.H., Salmon, J., Keenan, J.P., and Bellingham, A.J. (1981). Platelet adenine nucleotides and arachidonic acid metabolism in the myeloproliferative disorders. Thromb. Res. *22*, 389–397.

Sabin, F.R. (2002). Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick.

1917. J. Hematother. Stem Cell Res. *11*, 5–7.

Sandler, V.M., Lis, R., Liu, Y., Kedem, A., James, D., Elemento, O., Butler, J.M., Scandura, J.M., and Rafii, S. (2014). Reprogramming human endothelial cells to haematopoietic cells requires vascular induction. Nature *511*, 312–318.

Santilli, F., Romano, M., Recchiuti, A., Dragani, A., Falco, A., Lessiani, G., Fioritoni, F., Lattanzio, S., Mattoscio, D., De Cristofaro, R., et al. (2008). Circulating endothelial progenitor cells and residual in vivo thromboxane biosynthesis in low-dose aspirin-treated polycythemia vera patients. Blood *112*, 1085–1090.

Sanz, A., Ungureanu, D., Pekkala, T., Ruijtenbeek, R., Touw, I.P., Hilhorst, R., and Silvennoinen, O. (2011). Analysis of Jak2 Catalytic Function by Peptide Microarrays: The Role of the JH2 Domain and V617F Mutation. PLoS ONE *6*, e18522.

Savchenko, A.S., Martinod, K., Seidman, M.A., Wong, S.L., Borissoff, J.I., Piazza, G., Libby, P., Goldhaber, S.Z., Mitchell, R.N., and Wagner, D.D. (2014a). Neutrophil extracellular traps form predominantly during the organizing stage of human venous thromboembolism development. J. Thromb. Haemost. *12*, 860–870.

Savchenko, A.S., Borissoff, J.I., Martinod, K., De Meyer, S.F., Gallant, M., Erpenbeck, L., Brill, A., Wang, Y., and Wagner, D.D. (2014b). VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. Blood *123*, 141–148.

Schafer, A.I. (1984). Bleeding and thrombosis in the myeloproliferative disorders. Blood *64*, 1–12.

Scheubel, R.J., Zorn, H., Silber, R.-E., Kuss, O., Morawietz, H., Holtz, J., and Simm, A. (2003). Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells inpatients undergoing coronary artery bypass grafting. J. Am. Coll. Cardiol. *42*, 2073–2080.

Schwartz, S.M., and Benditt, E.P. (1976). Clustering of replicating cells in aortic endothelium. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *73*, 651–653.

Scott, L.M. (2011). The JAK2 exon 12 mutations: A comprehensive review. Am. J. Hematol. *86*, 668–676.

Scott, L.M., Scott, M., Campbell, P., and Green, A.R. (2006). Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. Blood *108*, 2435–2437.

Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., et al. (2007). JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. N. Engl. J. Med. *356*, 459–468.

Sekhar, M., McVinnie, K., and Burroughs, A.K. (2013). Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Br. J. Haematol. *162*, 730–747.

Sekhar, M., Patch, D., Austen, B., Howard, J., and Hart, S. Calreticulin mutations and their importance in splanchnic vein thrombosis. Br. J. Haematol. *174*, 158–160.

Semeraro, F., Ammollo, C.T., Morrissey, J.H., Dale, G.L., Friese, P., Esmon, N.L., and Esmon, C.T. (2011). Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: involvement of platelet TLR2 and TLR4. Blood *118*, 1952–1961.

Shantsila, E., and Lip, G.Y.H. (2009). The role of monocytes in thrombotic disorders. Insights from tissue factor, monocyte-platelet aggregates and novel mechanisms. Thromb. Haemost. *102*, 916–924.

Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., and Imaizumi, T. (2001). Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. Circulation *103*, 2776–2779.

Silver, R.T., Vandris, K., Wang, Y.L., Adriano, F., Jones, A.V., Christos, P.J., and Cross, N.C.P. (2011). JAK2V617F allele burden in polycythemia vera correlates with grade of myelofibrosis, but is not substantially affected by therapy. Leuk. Res. *35*, 177–182.

Slaba, I., Wang, J., Kolaczkowska, E., McDonald, B., Lee, W.-Y., and Kubes, P. (2015). Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice. Hepatology *62*, 1593–1605.

Smalberg, J.H., Arends, L.R., Valla, D.C., Kiladjian, J.-J., Janssen, H.L.A., and Leebeek, F.W.G. (2012). Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. Blood *120*, 4921–4928.

Sozer, S., Fiel, M.I., Schiano, T., Xu, M., Mascarenhas, J., and Hoffman, R. (2009a). The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. Blood *113*, 5246–5249.

Sozer, S., Ishii, T., Fiel, M.I., Wang, J., Wang, X., Zhang, W., Godbold, J., Xu, M., and Hoffman, R. (2009b). Human CD34+ cells are capable of generating normal and JAK2V617F positive endothelial like cells in vivo. Blood Cells. Mol. Dis. *43*, 304–312.

Stakos, D.A., Kambas, K., Konstantinidis, T., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Arelaki, S., Tsironidou, V., Giatromanolaki, A., Skendros, P., Konstantinides, S., et al. (2015). Expression of functional tissue factor by neutrophil extracellular traps in culprit artery of acute myocardial infarction. Eur. Heart J. *36*, 1405–1414.

Stefano, V.D., Fiorini, A., Rossi, E., Za, T., Farina, G., Chiusolo, P., Sica, S., and Leone, G. (2007). Incidence of the JAK2 V617F mutation among patients with splanchnic or cerebral venous thrombosis and without overt chronic myeloproliferative disorders. J. Thromb. Haemost. *5*, 708–714.

Storen, E.C., and Tefferi, A. (2001). Long-term use of anagrelide in young patients with essential thrombocythemia. Blood *97*, 863–866.

Strassel, C., Kubovcakova, L., Mangin, P.H., Ravanat, C., Freund, M., Skoda, R.C., Denis, C.V., Dupuis, A., Herbrecht, R., Gachet, C., et al. (2015). Haemorrhagic and thrombotic diatheses in mouse models with thrombocytosis. Thromb. Haemost. *113*, 414–425.

Streubel, B., Exner, M., and Schwarzinger, I. (2004). Lymphoma-Specific Genetic Aberrations

in Microvascular Endothelial Cells in B-Cell Lymphomas. N. Engl. J. Med. 10.

Swystun, L.L., and Liaw, P.C. (2016). The role of leukocytes in thrombosis. Blood *128*, 753–762.

Swystun, L.L., Shin, L.Y.Y., Beaudin, S., and Liaw, P.C. (2009). Chemotherapeutic agents doxorubicin and epirubicin induce a procoagulant phenotype on endothelial cells and blood monocytes. J. Thromb. Haemost. *7*, 619–626.

Takahashi, T., Kalka, C., Masuda, H., Chen, D., Silver, M., Kearney, M., Magner, M., Isner, J.M., and Asahara, T. (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. Nat. Med. *5*, 434–438.

Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., and Sendo, F. (1996). Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. J. Leukoc. Biol. *59*, 229–240.

Tatarsky, I., and Sharon, R. (1997). Management of polycythemia vera with hydroxyurea. Semin. Hematol. *34*, 24–28.

Tefferi, A. (2017). Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am. J. Hematol. *91*, 1262–1271.

Tefferi, A., and Barbui, T. (2017). Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am. J. Hematol. *92*, 94–108.

Tefferi, A., Rumi, E., Finazzi, G., Gisslinger, H., Vannucchi, A.M., Rodeghiero, F., Randi, M.L., Vaidya, R., Cazzola, M., Rambaldi, A., et al. (2013). Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. Leukemia *27*, 1874–1881.

Tefferi, A., Wassie, E.A., Guglielmelli, P., Gangat, N., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., et al. (2014a). Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. Am. J. Hematol. *89*, E121–E124.

Tefferi, A., Lasho, T.L., Finke, C., Belachew, A.A., Wassie, E.A., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., and Pardanani, A. (2014b). Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. Leukemia *28*, 1568–1570.

Tefferi, A., Guglielmelli, P., Larson, D.R., Finke, C., Wassie, E.A., Pieri, L., Gangat, N., Fjerza, R., Belachew, A.A., Lasho, T.L., et al. (2014c). Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood *124*, 2507–2513.

Tefferi, A., Lavu, S., Mudireddy, M., Lasho, T.L., Finke, C.M., Gangat, N., Pardanani, A., Hanson, C.A., Mannarelli, C., Guglielmelli, P., et al. (2017). JAK2 exon 12 mutated polycythemia vera: Mayo-Careggi MPN Alliance study of 33 consecutive cases and comparison with JAK2V617F mutated disease. Am. J. Hematol. *93*, E93–E96.

Tefferi, A., Vannucchi, A.M., and Barbui, T. (2018a). Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. Blood Cancer J. *8*.

Tefferi, A., Vannucchi, A.M., and Barbui, T. (2018b). Polycythemia vera treatment algorithm 2018. Blood Cancer J. *8*.

Teofili, L., Martini, M., Iachininoto, M.G., Capodimonti, S., Nuzzolo, E.R., Torti, L., Cenci, T., Larocca, L.M., and Leone, G. (2011). Endothelial progenitor cells are clonal and exhibit the JAK2V617F mutation in a subset of thrombotic patients with Ph-negative myeloproliferative neoplasms. Blood *117*, 2700–2707.

Thålin, C., Demers, M., Blomgren, B., Wong, S.L., von Arbin, M., von Heijne, A., Laska, A.C., Wallén, H., Wagner, D.D., and Aspberg, S. (2016). NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. Thromb. Res. *139*, 56–64.

Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., and Skoda, R.C. (2007). Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo. Blood *109*, 1503–1506.

Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., and Skoda, R.C. (2008). Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood *111*, 3931–3940.

Toltl, L.J., Beaudin, S., Liaw, P.C., and and the Canadian Critical Care Translational Biology Group (2008). Activated Protein C Up-Regulates IL-10 and Inhibits Tissue Factor in Blood Monocytes. J. Immunol. *181*, 2165–2173.

Tong, D., Yu, M., Guo, L., Li, T., Li, J., Novakovic, V.A., Dong, Z., Tian, Y., Kou, J., Bi, Y., et al. (2018). Phosphatidylserine-exposing blood and endothelial cells contribute to the hypercoagulable state in essential thrombocythemia patients. Ann. Hematol. *97*, 605–616.

Torres, C., Fonseca, A.M., Leander, M., Matos, R., Morais, S., Campos, M., and Lima, M. (2013). Circulating Endothelial Cells in Patients with Venous Thromboembolism and Myeloproliferative Neoplasms. PLOS ONE *8*, e81574.

Trappenburg, M.C., van Schilfgaarde, M., Marchetti, M., Spronk, H.M., Cate, H. t., Leyte, A., Terpstra, W.E., and Falanga, A. (2009). Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. Haematologica *94*, 911–918.

Treliński, J., Wierzbowska, A., Krawczyńska, A., Sakowicz, A., Pietrucha, T., Smolewski, P., Robak, T., and Chojnowski, K. (2010). Plasma levels of angiogenic factors and circulating endothelial cells in essential thrombocythemia: correlation with cytoreductive therapy and *JAK2–V617F* mutational status. Leuk. Lymphoma *51*, 1–7.

Tura, O., Crawford, J., Barclay, G.R., Samuel, K., Hadoke, P.W.F., Roddie, H., Davies, J., and Turner, M.L. (2010). Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) depresses angiogenesis in vivo and in vitro: implications for sourcing cells for vascular regeneration therapy. J. Thromb. Haemost. *8*, 1614–1623.

Turitto, V., and Weiss, H. (1980). Red blood cells: their dual role in thrombus formation. Science *207*, 541–543.

Turitto, V.T., and Weiss, H.J. (1983). Platelet and red cell involvment in mural thrombogenesis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *416*, 363–376.

Turon, F., Cervantes, F., Colomer, D., Baiges, A., Hernández-Gea, V., and Garcia-Pagán, J.C. (2015). Role of calreticulin mutations in the aetiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. J. Hepatol. *62*, 72–74.

Ueki, S., Melo, R.C.N., Ghiran, I., Spencer, L.A., Dvorak, A.M., and Weller, P.F. (2013). Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. Blood *121*, 2074–2083.

Ueki, S., Konno, Y., Takeda, M., Moritoki, Y., Hirokawa, M., Matsuwaki, Y., Honda, K., Ohta, N., Yamamoto, S., Takagi, Y., et al. (2016). Eosinophil extracellular trap cell death–derived DNA traps: Their presence in secretions and functional attributes. J. Allergy Clin. Immunol. *137*, 258–267.

Vajkoczy, P., Blum, S., Lamparter, M., Mailhammer, R., Erber, R., Engelhardt, B., Vestweber, D., and Hatzopoulos, A.K. (2003). Multistep Nature of Microvascular Recruitment of Ex Vivo–expanded Embryonic Endothelial Progenitor Cells during Tumor Angiogenesis. J. Exp. Med. *197*, 1755–1765.

VanDevanter, D.R., Craib, M.L., Pasta, D.J., Millar, S.J., Morgan, W.J., and Konstan, M.W. (2017). Cystic fibrosis clinical characteristics associated with dornase alfa treatment regimen change. Pediatr. Pulmonol. *53*, 43–49.

Vannucchi, A.M., Guglielmelli, P., Longo, G., Pancrazzi, A., Ponziani, V., Bogani, C., Ferrini, P.R., Rambaldi, A., Guerini, V., Bosi, A., et al. (2007). Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2V617F allele burden. Leukemia *21*, 1952–1959.

Vannucchi, A.M., Antonioli, E., Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Guerini, V., Barosi, G., Ruggeri, M., Specchia, G., Lo-Coco, F., Delaini, F., et al. (2008). Characteristics and clinical correlates of MPL 515W>L/K mutation in essential thrombocythemia. Blood *112*, 844–847.

Vannucchi, A.M., Kiladjian, J.J., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Mesa, R., et al. (2015). Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. N. Engl. J. Med. *372*, 426–435.

Vannucchi, A.M., Verstovsek, S., Guglielmelli, P., Griesshammer, M., Burn, T.C., Naim, A., Paranagama, D., Marker, M., Gadbaw, B., and Kiladjian, J.-J. (2017). Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study. Ann. Hematol. *96*, 1113–1120.

Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., et al. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood *114*, 937–951.

Vedovati, M.C., Germini, F., Agnelli, G., and Becattini, C. (2015). Direct Oral Anticoagulants in Patients With VTE and Cancer. Chest *147*, 475–483.

Verger, E., and Cassinat, B. (2015). Clinical and molecular response to interferon-a therapy in

essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *126*, 8.

Verstovsek, S., Vannucchi, A.M., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Kirito, K., et al. (2016). Ruxolitinib versus best available therapy in patients with polycythemia vera: 80-week follow-up from the RESPONSE trial. Haematologica *101*, 821–829.

Vischer, U.M., and Wollheim, C.B. (1997). Epinephrine induces von Willebrand factor release from cultured endothelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent signalling in exocytosis. Thromb. Haemost. *77*, 1182–1188.

Vreeken, J., and van Aken, W.G. (1971). Spontaneous aggregation of blood platelets as a cause of idiopothic thrombosis and recurrent painful toes and fingers. Lancet Lond. Engl. *2*, 1395–1397.

Wakefield, T.W., Myers, D.D., and Henke, P.K. (2008). Mechanisms of Venous Thrombosis and Resolution. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 387–391.

Wang, J., and Kubes, P. (2016). A Reservoir of Mature Cavity Macrophages that Can Rapidly Invade Visceral Organs to Affect Tissue Repair. Cell *165*, 668–678.

Wang, S., and Wang, Y. (2013). Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech. *1829*, 1126–1135.

Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. Science *349*, 316–320.

Wautier, M.-P., El Nemer, W., Gane, P., Rain, J.-D., Cartron, J.-P., Colin, Y., Le Van Kim, C., and Wautier, J.-L. (2007). Increased adhesion to endothelial cells of erythrocytes from patients with polycythemia vera is mediated by laminin 5 chain and Lu/BCAM. Blood *110*, 894–901.

Wijelath, E.S., Rahman, S., Murray, J., Patel, Y., Savidge, G., and Sobel, M. (2004). Fibronectin promotes VEGF-induced CD34+ cell differentiation into endothelial cells. J. Vasc. Surg. *39*, 655–660.

Willis, V.C., Gizinski, A.M., Banda, N.K., Causey, C.P., Knuckley, B., Cordova, K.N., Luo, Y., Levitt, B., Glogowska, M., Chandra, P., et al. (2011). N-α-Benzoyl-N5-(2-Chloro-1-Iminoethyl)-l-Ornithine Amide, a Protein Arginine Deiminase Inhibitor, Reduces the Severity of Murine Collagen-Induced Arthritis. J. Immunol. *186*, 4396–4404.

Wolach, O., Sellar, R.S., Martinod, K., Cherpokova, D., McConkey, M., Chappell, R.J., Silver, A.J., Adams, D., Castellano, C.A., Schneider, R.K., et al. (2018a). Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Sci. Transl. Med. *10*, eaan8292.

Wolach, O., Sellar, R.S., Martinod, K., Cherpokova, D., McConkey, M., Chappell, R.J., Silver, A.J., Adams, D., Castellano, C.A., Schneider, R.K., et al. (2018b). Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Sci. Transl. Med. *10*, eaan8292.

Wolach, O., Sellar, R.S., Martinod, K., Cherpokova, D., McConkey, M., Chappell, R.J., Silver, A.J., Adams, D., Castellano, C.A., Schneider, R.K., et al. (2018c). Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Sci. Transl. Med. *10*, eaan8292.

Wolanskyj, A.P., Schwager, S.M., McClure, R.F., Larson, D.R., and Tefferi, A. (2006). Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors. Mayo Clin. Proc. *81*, 159–166.

Wong, S.L., Demers, M., Martinod, K., Gallant, M., Wang, Y., Goldfine, A.B., Kahn, C.R., and Wagner, D.D. (2015). Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. Nat. Med. *21*, 815–819.

Wu, J., Huang, L., Huang, M., Liu, W., Zheng, M., Cao, Y., Liu, Y., Zhang, Y., Lu, Y., Xu, G., et al. (2009). Dominant contribution of malignant endothelial cells to endotheliopoiesis in chronic myeloid leukemia. Exp. Hematol. *37*, 87–91.

Wu, X., Lensch, M.W., Wylie-Sears, J., Daley, G.Q., and Bischoff, J. (2007). Hemogenic Endothelial Progenitor Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. Stem Cells *25*, 2770–2776.

Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C.T., Semeraro, F., Taylor, F.B., Esmon, N.L., Lupu, F., and Esmon, C.T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. Nat. Med. *15*, 1318–1321.

Yalavarthi, S., Gould, T.J., Rao, A.N., Mazza, L.F., Morris, A.E., Núñez-Álvarez, C., Hernández-Ramírez, D., Bockenstedt, P.L., Liaw, P.C., Cabral, A.R., et al. (2015). Release of Neutrophil Extracellular Traps by Neutrophils Stimulated With Antiphospholipid Antibodies: A Newly Identified Mechanism of Thrombosis in the Antiphospholipid Syndrome. Arthritis Rheumatol. *67*, 2990–3003.

Yan, S.-F., Mackman, N., Kisiel, W., Stern, D.M., and Pinsky, D.J. (1999). Hypoxia/Hypoxemia-Induced Activation of the Procoagulant Pathways and the Pathogenesis of Ischemia-Associated Thrombosis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *19*, 2029–2035.

Yang, X., Li, L., Liu, J., Lv, B., and Chen, F. (2016). Extracellular histones induce tissue factor expression in vascular endothelial cells via TLR and activation of NF-κB and AP-1. Thromb. Res. *137*, 211–218.

Yipp, B.G., Petri, B., Salina, D., Jenne, C.N., Scott, B.N.V., Zbytnuik, L.D., Pittman, K., Asaduzzaman, M., Wu, K., Meijndert, H.C., et al. (2012). Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. Nat. Med. *18*, 1386–1393.

Yoder, M.C. (2010). Is Endothelium the Origin of Endothelial Progenitor Cells? Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *30*, 1094–1103.

Yoder, M.C., Mead, L.E., Prater, D., Krier, T.R., Mroueh, K.N., Li, F., Krasich, R., Temm, C.J., Prchal, J.T., and Ingram, D.A. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. Blood *109*, 1801–1809.

Yousefi, S., Gold, J.A., Andina, N., Lee, J.J., Kelly, A.M., Kozlowski, E., Schmid, I.,

Straumann, A., Reichenbach, J., Gleich, G.J., et al. (2008). Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nat. Med. *14*, 949–953.

Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., and Simon, H.U. (2009). Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. Cell Death Differ. *16*, 1438–1444.

Yousefi, S., Simon, D., and Simon, H.-U. (2012). Eosinophil extracellular DNA traps: molecular mechanisms and potential roles in disease. Curr. Opin. Immunol. *24*, 736–739.

Yousefi, S., Morshed, M., Amini, P., Stojkov, D., Simon, D., Gunten, S. von, Kaufmann, T., and Simon, H.-U. (2015). Basophils exhibit antibacterial activity through extracellular trap formation. Allergy *70*, 1184–1188.

Yu, Q.C., Song, W., Wang, D., and Zeng, Y.A. (2016). Identification of blood vascular endothelial stem cells by the expression of protein C receptor. Cell Res. *26*, 1079–1098.

Zabieglo, K., Majewski, P., Majchrzak-Gorecka, M., Wlodarczyk, A., Grygier, B., Zegar, A., Kapinska-Mrowiecka, M., Naskalska, A., Pyrc, K., Dubin, A., et al. (2015). The inhibitory effect of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) on formation of neutrophil extracellular traps. J. Leukoc. Biol. *98*, 99–106.

Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A. (2011). Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. Blood *118*, 6743–6751.

Zhan, H., Lin, C.H.S., Segal, Y., and Kaushansky, K. (2018). The JAK2V617F-bearing vascular niche promotes clonal expansion in myeloproliferative neoplasms. Leukemia *32*, 462–469.

Zhao, B., Keerthivasan, G., Mei, Y., Yang, J., McElherne, J., Wong, P., Doench, J.G., Feng, G., Root, D.E., and Ji, P. (2014). Targeted shRNA screening identified critical roles of pleckstrin-2 in erythropoiesis. Haematologica *99*, 1157–1167.

Zhao, B., Mei, Y., Cao, L., Zhang, J., Sumagin, R., Yang, J., Gao, J., Schipma, M.J., Wang, Y., Thorsheim, C., et al. (2017). Loss of pleckstrin-2 reverts lethality and vascular occlusions in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. J. Clin. Invest. *128*, 125–140.

Zhao, B.-Q., Chauhan, A.K., Canault, M., Patten, I.S., Yang, J.J., Dockal, M., Scheiflinger, F., and Wagner, D.D. (2009). von Willebrand factor-cleaving protease ADAMTS13 reduces ischemic brain injury in experimental stroke. Blood *114*, 3329–3334.

Zovein, A.C., Hofmann, J.J., Lynch, M., French, W.J., Turlo, K.A., Yang, Y., Becker, M.S., Zanetta, L., Dejana, E., Gasson, J.C., et al. (2008). Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell *3*, 625–636.

Titre : Rôle des cellules endothéliales avec mutation JAK2V617F et des polynucléaires neutrophiles dans la physiopathologie de la thrombose des néoplasies myéloprolifératives

Résumé : Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des maladies hématologiques acquises de la cellule souche hématopoiétique (CSH) caractérisées par une prolifération accrue de cellules sanguines. Une mutation activatrice de la protéine JAK2 (JAK2V617F) a été identifiée chez plus de 50% des patients. La survenue de thromboses au niveau artériel et veineux constitue une des principales complications au cours de ces maladies. Au cours d'un premier axe de travail, nous avons souhaité étudier les conséquences sur la physiopathologie de la thrombose de la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales (CE). Utilisant deux approches complémentaires, *in vitro* avec l'utilisation de cellules endothéliales veineuses, et *in vivo* avec l'utilisation d'un modèle murin permettant la présence de la mutation JAK2V617F dans le compartiment endothélial, nous avons démontré que la présence de CE JAKV617F favorisait la survenue de thrombose. Cette augmentation de la survenue de thrombose était médiée par une augmentation de l'adhésion des leucocytes au niveau des CE JAK2V617F, secondaire à une augmentation d'expression de P-Sélectine à leur surface. Ce travail a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme de la physiopathologie de la thrombose au cours des NMP JAK2V617F. Au cours d'un second axe de travail, nous avons étudié les polynucléaires neutrophiles (PNN) et le phénomène de NETose (formation de neutrophil extracellular traps ou NET) au cours des NMP. Nous avons démontré que la formation de NET était augmentée dans une cohorte de patients avec NMP, tout comme des marqueurs indirects de NETose (ADN plasmatique, MPO-ADN plasmatique). Nous avons mis en évidence que les taux de MPO-ADN plasmatique étaient plus élevés chez les patients avec antécédents de thrombose par rapport aux patients sans. Nous avons confirmé ces résultats à l'aide de deux modèles murins différents dans lesquels nous avons également retrouvé une formation de NET augmentée. Nous avons mis en évidence que cette formation de NET participait à la physiopathologie de la thrombose, l'administration de DNAse entraînant une réduction de la survenue de thrombose. Enfin, nous avons démontré que les plaquettes JAK2V617F stimulaient la production de NET par les PNN JAK2V617F, suggérant une collaboration de ces deux types cellulaires au cours de la physiopathologie de la thrombose des NMP.

Mots clés : Néoplasies myéloprolifératives, Cellules endothéliales, Polynucléaires neutrophiles, Thrombose, NET, mutation JAK2V617F.

Title: Implication of JAK2V617F endothelial cells and neutrophils in the physiopathology of thrombosis during myeloproliferative neoplasms

Summary: Myeloproliferative neoplasms (MPN) are acquired hematologic diseases of the hematopoietic stem cell (HSC) characterized by blood cell proliferation. An activating mutation of the protein JAK2 (JAK2V617F) has been identified in more than 50% of patients. The occurrence of arterial and venous thrombosis is one of the main complications during these diseases. We first studied the consequences of the presence of the JAK2V617F mutation in endothelial cells (EC) on the physiopathology of thrombosis. We used two complementary approaches, in vitro with the use of human venous endothelial cells, and in vivo with the use of a mouse model allowing the presence of the JAK2V617F mutation only in the endothelial compartment: the *PDGFb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ model. We first observed that *PDGFb-iCreERT2;JAK2*$^{V617F/WT}$ mice displayed a higher propensity for thrombosis. This increased thrombus formation was mediated by an increased leukocyte adhesion in presence of JAK2V617F EC, secondary to an increase in P-Selectin expression at their surface. This work made it possible to highlight a new mechanism of the physiopathology of thrombosis during JAK2V617F MPN. Then we studied neutrophils and the phenomenon of NETosis (formation of neutrophil extracellular traps or NET) during MPN. We demonstrated that NET formation was increased in a cohort of patients with MPN, such as indirect markers of NETosis (plasmatic DNA and MPO-DNA). We found that plasma MPO-DNA levels were higher in patients with a history of thrombosis compared to patients without. We confirmed these results using two different mouse models in which we also found increased NET formation. We found that NET formation was involved in the physiopathology of thrombosis, as DNAse administration resulted in a reduction of thrombosis occurrence. Finally, we demonstrated that JAK2V617F platelets stimulated NET formation by JAK2V617F neutrophils, suggesting collaboration of these two cell types during the physiopathology of thrombosis during MPN.

Key words: Myeloproliferative neoplasms, endothelial cells, neutrophils, thrombosis, NET, JAK2V617F mutation