



HAL
open science

Coopération entre les mutations Jak2 V617F et Srsf2 P95H dans le système hématopoïétique

Christophe Willekens

► **To cite this version:**

Christophe Willekens. Coopération entre les mutations Jak2 V617F et Srsf2 P95H dans le système hématopoïétique. Cancer. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL076 . tel-03768302

HAL Id: tel-03768302

<https://theses.hal.science/tel-03768302v1>

Submitted on 3 Sep 2022

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.

Coopération entre les mutations
Jak2 V617F et Srsf2 P95H
dans le système hématopoïétique
*Cooperation between Jak2 V617F and
Srsf2 P95H in hematopoietic system*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 582, Cancérologie : Biologie-Médecine-Santé (CBMS)

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, Cellules souches
hématopoïétiques et développement des hémopathies myéloïdes, 94805, Villejuif,
France.

Réfèrent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
le 21/10/2021, par**

Christophe WILLEKENS

Composition du Jury

François GIRODON

PU-PH, Université Bourgogne

Président

Michel AURRAND-LYONS

DR, Aix-Marseille Université

Rapporteur & Examineur

Éric LIPPERT

PU-PH, Université de Bretagne

Rapporteur & Examineur

Véronique MAGUER-SATTA

DR, Université Lyon 1

Examinatrice

William VAINCHENKER

DR émérite, Université Paris Saclay

Examineur

Direction de la thèse

Éric SOLARY

PU-PH, Université Paris Saclay

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier chacune des personnes qui a participé, directement ou indirectement, à ce travail car comme j'ai pu l'apprendre durant ces quelques années, une thèse de science est un travail que l'on mène seul qui demeure irréalisable sans l'aide de personnes bienveillantes.

Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer et de juger mon travail, et de participer à cette soutenance. Je remercie le Pr Francois Girodon d'accepter la présidence de ce jury. Je remercie chaleureusement les Dr Michel Aurrand-Lyons et le Pr Eric Lippert d'avoir accepté la charge de rapporteur. Je remercie également le Véronique Maguer-Satta d'avoir accepté le rôle d'examinatrice.

Je remercie Aurélie De Thonel et Martin Dutertre d'avoir accepté de participer à mon comité de mi-thèse.

Je souhaite remercier le Pr Eric Solary de m'avoir accueilli dans son unité de recherche pour y effectuer ma thèse et de m'avoir donné sa confiance dans la gestion de ce long travail qui m'aura appris énormément de choses, tant sur le plan scientifique que personnel. La carte blanche que tu as su m'accorder pour certains pans de ce travail, ta capacité d'organisation et les opportunités de collaborations scientifiques que tu m'as proposé ont permis de faire de ce travail ce qu'il est aujourd'hui. Je te remercie également d'avoir supporté mon pessimisme (je préférerais dire scepticisme !) et d'avoir toléré mes défauts d'organisation d'ordre administratif. Enfin, un grand merci pour cette dernière ligne droite de rédaction de thèse et d'article.

Je remercie le Dr William Vainchenker d'avoir accepté d'être membre de ce jury mais encore plus des discussions que nous avons pu avoir sur mon sujet de thèse (et le reste) et du temps que vous m'avez accordé pendant ces 4 années. Vous êtes un véritable modèle pour des générations d'étudiants en recherche.

Je remercie Patrick Gonin et l'ensemble du personnel de l'animalerie et en particulier Laure Touchard, Mirile Ganga, Mélanie Polrot pour leur aide indispensable tout au long de ces années. Je remercie Richard Dyunga qui m'a grandement aidé dans la gestion des génotypages de mon élevage.

Je remercie très chaleureusement Catherine Lacout, qui m'a accompagné pendant ma 1^{ère} année (et celles qui ont suivi) et m'a formé à l'expérimentation animale. Sans toi, mon projet de thèse ne se serait certainement pas déroulé de la même manière.

Je remercie mon « papa » de la cytométrie, Philippe Rameau, et (son fils) Cyril Catelain pour toutes ses heures passées devant les cytomètres et le trieur toujours dans la bonne humeur. Je remercie Alexia Alfaro (la fille de papa) pour son travail (et surtout sa patience) sur l'analyse bio-informatique (« on tient le bon bout »).

Je remercie Olivia Bawa, Helene Rocheteau, Sylvie Souquere et Nicolas Signolle pour tout le travail effectué en histologie et microscopie, leur gentillesse et disponibilité. Je remercie Maxime Annereau pour son apport au projet ainsi qu'Aymeric Silvin et Florent Ginhoux pour leur aide dans l'analyse des populations monocytaires.

Je remercie Rebekka Schneider, Remco Hoogenboezem et Inge Snoeren, de l'université Erasmus à Rotterdam, pour leur aide et disponibilité pour la réalisation des RNAseq et leur analyse.

Je remercie Alex Penson et Omar Abdel-Wahab, du Memorial Sloan Kettering à New-York, de nous avoir fourni le modèle murin Srsf2 mutant et pour leur travail sur l'analyse de l'épissage.

Je remercie Stéphane Giraudier de l'hôpital Saint Louis, qui nous a fourni des échantillons de patients pour valider nos résultats chez l'homme.

Je remercie Léa Poisot de l'école doctorale, pour son aide et sa patience vis-à-vis de mes manquements administratifs.

Je remercie tous mes collègues du département d'hématologie et du laboratoire d'hématologie, en particulier Claude Chahine et Khalil Saleh pour leur rapidité dans la « gestion de mon agenda », Stéphane De Botton pour son soutien indéfectible et Véronique Saada pour ces fameuses lames de frottis sanguin de souris.

Je remercie les chercheurs de mon unité et en particulier Nathalie Droin, Dorothée Selimoglu-Buet, Françoise Porteu, Emilie Elvira-Matelot, Caroline Marty, Isabelle Plo et Jean-Luc Villeval qui ont permis que ce projet voit le jour, qu'il progresse et se finalise.

Je remercie mes compagnons du laboratoire qui m'ont aidé par générosité afin de finaliser ces travaux et en particulier Tracy Dagher, Camelia Benlabiod, Valérie Edmond et Valentine Marchand. Je remercie tous les camarades thésards qui m'ont accompagné et en particulier Franck Debeurme, Margaux Sevin, Margot Morabito, Chloé Jego, Allan Beke, Yanis Pelinski, Mael Heiblig, Aygun Imanci, Amandine Tisserand, Mathieu Mosca, Alessandro Donada (et tous ceux que je n'ai pas cité) pour votre aide, nos discussions et les bons moments passés ensemble.

Je souhaite également remercier ceux qui m'ont permis de m'évader et de m'enrichir, en particulier Takeshi Kovacs, Paul Atreides, Geralt de Riv, Oziel du Drac, Maurice Druon, George Orwell, Saitama, Peter Parker, Steve Rogers, Bruce Wayne, Jin Sakai, Kratos, sans oublier Angus Young, Hans Zimmer, Fabrice Drouelle et Franck Ferrand.

Je ne remercie pas le Sars-CoV-2.

Je souhaite remercier chaleureusement Lucie Laplane, pour ces années au laboratoire à discuter science (et autre), à partager mes doutes (et mes joies) durant toutes ces années de dur labeur. Je te remercie pour ta présence indéfectible et tout ce travail que tu as réalisé. J'espère que tout cela n'aura été que le début de notre collaboration (et amitié).

Je remercie évidemment ma famille et mes amis, en particulier Julien Rossignol, mon ami de « trente ans », pour nos discussions, nos parties de squash (et les pintes qui vont avec).

Enfin, je remercie du fond du cœur mes trois princesses, Amandine, Livia et Manon pour leur présence, leur amour et tout ce temps que je n'ai pu leur accorder le soir, les week-end et pendant les vacances (« Y en a marre de ton boulot sur ton ordinateur, Papa ! »). Je vous aime et vous dédicace cette thèse.

Sommaire

Remerciements	1
Sommaire	3
Liste des abréviations	4
Introduction.....	7
1. HEMATOPOÏÈSE ET MEGACARYOPOÏÈSE NORMALE	7
1.1. Définitions et généralités	7
1.2. Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs multipotents	7
1.3. Processus de différenciation et sélection de lignage	9
1.4. Mégacaryopoïèse	11
1.4.2. <i>Maturation du mégacaryocyte</i>	12
1.4.3. <i>Propriétés et fonctions du mégacaryocyte</i>	15
2. NEOPLASMES MYELOPROLIFÉRATIFS	16
2.1. Généralités et classification des néoplasmes myéloprolifératifs.....	16
2.1.1. <i>Définitions et généralités sur les hémopathies malignes</i>	16
2.1.2. <i>Les différentes entités de néoplasmes myéloprolifératifs</i>	17
2.2. Caractéristiques biologiques des NMP.....	20
2.2.1. Caractéristiques phénotypiques communes des CSH et progéniteurs de NMP	20
2.2.2. Mutations affectant la voie de signalisation JAK2-STAT dans les NMP (mutations « driver »)	21
2.2.3. Rôle des mutations « non-driver » dans les NMP	26
2.3. Risques évolutifs des NMP	34
2.3.1. Evolution d'une TE/PV en myélofibrose.....	34
2.3.2. Transformation d'un NMP en leucémie aigüe myéloïde	42
Objectifs du travail de thèse	45
Article de thèse.....	47
Discussion et perspectives	93
Références bibliographiques	103
Publications et Communications en congrès	120

Liste des abréviations

A

ADN: *Acide Désoxyribonucléique*

AKT: *AKT Serine/Threonine Kinase*

ARN: *Acide ribonucléique*

ASXL1: *Additional Sex Combs Like 1*

B

BCOR: *Bcl6 corepressor*

C

CALR: *calréticuline*

CBL: *Casitas B-Cell lymphoma*

CHIP: *Clonal hematopoiesis of indeterminate potential*

CRISPR-Cas9 : *clustered regularly interspaced short palindromic repeats – associated protein 9*

CSH: *Cellule souche hématopoïétique*

CXCL4: *Platelet Factor 4 (PF4)*

D

DNMT3A: *DNA Methyltransferase 3 Alpha*

E

EDTA: *Éthylène diamine tétra-acétique*

ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

EZH2: *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*

F

FACS: *Fluorescence activated cell sorting*

FLT3: *Fms-like tyrosine kinase 3*

FvW: *Facteur von Willebrand*

G

Gli-1: *glioma-associated oncogene homolog 1*

GM-CSF: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*

G-CSF: *Granulocyte-colony stimulating factor*

H

HES: *Hématoxyline, éosine, safran*

HSP27: *Heat shock protein 27*

I

IDH : *Isocitrate deshydrogenase*

IL-6 : *Interleukin 6*

IL-8 : *Interleukin-8*

IL-10: *Interleukin 10*

J

JAK2: *Janus kinase 2*

K

KI: *Knock-In*

KRAS: *KRAS Proto-Oncogene*

L

LAM : *Leucémie aiguë myéloïde*

LMMC : *Leucémie myélomonocytaire chronique*

LSK: *Lineage negative, Sca-1+, c-Kit+ cells*

M

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MF: *Myélofibrose*

MFP: *Myélofibrose primitive*

MO: *Moelle Osseuse*

MPL : *myeloproliferative leukemia protein*

N

NF-κB : *Nuclear*

NGS: *Next-Generation Sequencing*

NK: *Natural Killer cel*

NMD : *Non-sense Mediated Decay*

NMP: *Néoplasme Myéloprolifératifs*

NRAS: *NRAS Proto-Oncogene*

O

OMS: *Organisation Mondiale de la Santé*

P

P21: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*

P53: *Tumor protein P53*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PF4: *Platelet Factor 4 (CXCL4)*

PI3K: *Phosphoinositide-3-Kinase*

plpC: *polyinosinic:polycytidylic acid*

PRPF8: *Pre-mRNA Processing Factor 8*

PTPN11: *Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11*

PV: *Polyglobulie de Vaquez*

R

ROS: *Espèces réactives de l'oxygène*

RT-qPCR: *Quantitative reverse transcription PCR*

RUNX1: *Runt Related Transcription Factor 1*

S

SCL: *stem cell leukemia*

SETBP1: *SET binding protein 1*

SF3B1: *Splicing Factor 3b Subunit 1*

SH2: *Src-Homology-2 domain*

SLAM: *LSK/CD150+/CD48- cells*

SMD: *syndrome myélodysplasique*

SRSF2: *Serine and Arginine Rich Splicing Factor 2*

STAT: *signal transducer and activator of transcription*

T

TE: *Thrombocythémie essentielle*

TET2: *Ten-eleven translocation 2*

TGF- β : *Transforming Growth Factor Beta*

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha*

TP53: *Tumor Protein P53*

TPO: *Thrombopoïétine*

U

U2AF1: *U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor*

V

VEGF: *Vascular endothelium growth factor*

W

WES: *Whole-Exome Sequencing*

Introduction

1. HEMATOPOÏÈSE ET MEGACARYOPOÏÈSE NORMALE

1.1. Définitions et généralités

L'hématopoïèse désigne le processus physiologique de production des cellules sanguines matures (10^{11} - 10^{12} cellules par jour) et se déroule, chez l'adulte sain, dans la moelle osseuse. Chacune des populations générées par le système hématopoïétique est issue d'une population cellulaire restreinte : les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Ces CSH ont la capacité de s'autorenouveler tout au long de la vie et sont multipotentes. Elles ont donc la capacité de se différencier en progéniteurs puis en précurseurs dont le potentiel se restreint progressivement, l'étape terminale de ce processus étant la formation des cellules sanguines matures que sont les globules rouges, les plaquettes, et les populations leucocytaires myéloïdes et lymphoïdes. Ces cellules matures ayant généralement une durée de vie limitée à quelques jours ou semaines, les CSH permettent leur renouvellement continu.

La différenciation d'une CSH en une cellule mature est un processus complexe faisant intervenir de multiples mécanismes biologiques, en particulier le remodelage de la chromatine, la transcription de gènes et les signaux intracellulaires activés par de multiples cytokines.

1.2. Cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs multipotents

1.2.1. Phénotypes des CSH

Le concept de CSH est né dans les années 1950 avec l'observation de la régénération de l'ensemble des cellules hématopoïétiques par injection de cellules de moelle osseuse de souris saine à une souris irradiée à dose létale. Les travaux qui ont suivi, de plus en plus précis avec le développement technologique, ont montré qu'un nombre infime des cellules de la moelle osseuse correspond à des CSH dotées de capacités d'autorenouvellement et de différenciation en n'importe quelle cellule hématopoïétique mature.

Du point de vue fonctionnel, il est couramment admis que les cellules capables de reconstituer de manière durable (>16 semaines) l'hématopoïèse après transplantation et de se maintenir en transplantation secondaire peuvent être considérées comme des CSH.¹

Le phénotype des CSH murines a été précisé par des techniques de tri cellulaire (basées sur l'expression d'une combinaison de protéines à la surface des cellules) suivi de transplantation. Depuis les années 2000, on considère que les CSH n'expriment pas les marqueurs de lignage des cellules matures (on dit qu'elles sont « Lineage negative » ou Lin⁻) ; elles expriment fortement les marqueurs c-Kit et Sca-1 (LSK), faiblement le marqueur Thy1.1 (CD90) et pas du tout marqueurs CD34 et Flk2 (récepteur à tyrosine kinase appelé aussi FLT-3 ou CD135). Ces CSH (Lin⁻ ; c-Kit⁺, Sca-1⁺, Thy1.1^{low}, CD34⁻, Flk2⁻) sont appelées CSH de longue durée (« long-term HSC » ; LT-HSC). Ces CSH majoritairement quiescentes sont distinguées des CSH de courte durée (« short term HSC » ; ST-HSC) qui expriment les marqueurs CD34 et Flk2 et possèdent un potentiel d'autorenouvellement limité dans le temps.² Les marqueurs CD150 (SLAMF1) et CD48 (SLAMF2), qui appartiennent à la famille SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule), permettent de distinguer, au sein des LSK, les CSH dites « SLAM »

(LSK, CD48⁻, CD150⁺) de cellules hématopoïétiques progénitrices multipotentes (LSK, CD48⁻, CD150⁻) ou pluripotentes (LSK, CD48⁺, CD150⁻).³ Il a été montré que les CSH « SLAM » représentent 0.0058% de la moelle osseuse totale et qu'une seule d'entre elles est suffisante pour reconstituer une hématopoïèse à long terme.

Chez l'homme, il est communément admis que la fraction Lin⁻ CD34⁺ CD38⁻ CD90⁺ CD45RA⁻ contient les CSH qui génèrent une population de cellules progénitrices multipotentes de phénotype Lin⁻ CD34⁺ CD38⁻ CD90⁻ CD45RA⁻.⁴

Les technologies mises en œuvre au cours de la décennie 2010, en particulier les analyses réalisées à l'échelle unicellulaire, ont apporté des résultats qui remettent en cause le caractère homogène des CSH identifiées à l'aide de ces marqueurs. D'autres marqueurs tels que EPCR, la rhodamine, CD229 (SLAMF3), CD244 (Natural Killer Cell Receptor 2B4) et CD41 (intégrine α 2b) ont permis d'identifier, au sein de la population des « CSH », des sous-populations aux capacités de différenciation différentes.⁵⁻⁷ Certaines CSH, tout en conservant des capacités d'autorenouvellement, sont déjà engagées dans un processus de différenciation vers un lignage spécifique, en particulier le lignage mégacaryocytaire, afin de produire rapidement des cellules matures en réponse à une situation de stress sans passer par les différentes étapes de différenciation identifiées en l'absence de stress.⁷⁻⁹

1.2.2. Propriétés et interactions des CSH

Les CSH identifiées et triées en utilisant les marqueurs décrits précédemment, avec les limites qui ont été rappelées, se sont avérées être majoritairement quiescentes (phase G0 du cycle cellulaire). Elles ont une faible activité mitochondriale et activent le processus d'autophagie, ce qui les protège vis-à-vis des agressions extérieures et leur permet de persister tout au long de l'existence.¹

La balance entre auto-renouvellement et différenciation des CSH est contrôlée par de multiples régulateurs intrinsèques, transcriptionnels, épigénétiques et métaboliques. Les gènes qui régulent leur autorenouvellement sont principalement des gènes de la famille *HOX* et ceux des voies de signalisation Notch, Sonic Hedgehog et Wnt / β -caténine.

Cette balance implique aussi de nombreux facteurs extrinsèques par l'effet d'interactions directes (contacts cellulaires) et indirectes (cytokines et chimiokines) avec d'autres cellules, hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Ces interactions extrinsèques se produisent dans la moelle osseuse, au sein d'un micro-environnement communément appelé « niche hématopoïétique ». Celle-ci se situe principalement dans la moelle osseuse du squelette axial et dans les zones excentrées (zones trabéculaires proches de l'endoste, la surface interne de l'os cortical) plutôt qu'au centre de la moelle osseuse. Elle est ainsi plus proche du périoste, qui correspond à la couche externe de l'os, richement vascularisée et innervée, constituant une source de nutriments, d'oxygène, de neurotransmetteurs, d'hormones et de cytokines pour le tissu hématopoïétique.¹⁰

Au sein de cette niche hématopoïétique, il existe différentes cellules non hématopoïétiques, dites stromales, interagissant avec les CSH. Historiquement, les ostéoblastes sont les premières cellules identifiées comme étant nécessaires aux CSH, même si leur rôle a été récemment minimisé. Les travaux réalisés ces 10 dernières années ont montré un rôle majeur des cellules dont dérivent les ostéoblastes, les cellules souches et progénitrices mésenchymateuses (notamment celles porteuses du récepteur à la leptine ; LEPR) qui ont la capacité de se différencier en cellules des lignages osseux, adipeux et cartilagineux. Ces cellules, situées au contact des vaisseaux sanguins sinusoides, peuvent

générer *ex-vivo* un tissu de soutien aux CSH en exprimant la chimiokine CXCL12 (encore appelée stromal cell-derived factor 1 ou SDF-1), la cytokine SCF (Stem Cell Factor, le ligand du récepteur c-Kit), l'angiopoïétine 1 (Tie2, codée par *ANGPT1*), l'ostéopontine (codée par *OPN*) et l'interleukine-7 (IL-7), toutes ces protéines étant nécessaires au maintien des CSH dans la moelle osseuse. Parmi les autres cellules impliquées dans le maintien et la fonction des CSH au sein de ce microenvironnement, les adipocytes sont probablement des régulateurs négatifs de la fonction des CSH, en particulier par l'adiponectine qu'elles produisent, tandis que les cellules gliales des nerfs sympathiques interviennent dans la rétention des CSH dans la niche. Enfin, la moelle est richement vascularisée et les CSH se localisent à proximité et au contact des cellules endothéliales, qu'il s'agisse de celles des artérioles ou des capillaires sinusoides de la moelle osseuse.¹⁰

Parmi les acteurs de la niche hématopoïétique interagissant avec les CSH, on trouve également des cellules hématopoïétiques matures, issues de la différenciation des CSH, en particulier les mégacaryocytes (qui interviennent dans la régulation des CSH en produisant du transforming growth factor bêta (TGF β), du platelet-factor 4 (PF4), de la thrombopoïétine (TPO) et la chimiokine CXCL4) ainsi que les cellules T régulatrices (qui contribuent à la quiescence des CSH), les macrophages et les polynucléaires neutrophiles.¹⁰

En résumé, un nombre infime des cellules de la moelle osseuse correspond à des CSH, majoritairement quiescentes, néanmoins dotées de capacités d'autorenouvellement et de reconstitution durable de l'hématopoïèse après transplantation. Leur homogénéité a été récemment remise en cause, certaines cellules encore capables d'autorenouvellement étant engagées dans un processus de différenciation. La balance entre auto-renouvellement et différenciation est contrôlée par de multiples signaux intrinsèques et extrinsèques, ces derniers étant générés par la niche hématopoïétique.

1.3. Processus de différenciation et sélection de lignage

1.3.1. De la CSH aux cellules hématopoïétiques matures

Le processus de différenciation (sélection d'un lignage) d'une CSH, au sommet de la pyramide hiérarchique de l'hématopoïèse, en n'importe quelle cellule hématopoïétique, à la base de la pyramide, est unidirectionnel et définitif. Ainsi, à quelques exceptions, chaque étape de différenciation restreint le potentiel de la cellule à un ou quelques lignages.

La première étape commune à toute CSH est la différenciation en progéniteur multipotent dit MPP (« multipotent progenitor » ; LSK, CD90⁻, Flk2⁺, CD34⁺, CD150⁻). Les MPP possèdent des capacités très limitées d'autorenouvellement mais gardent la capacité de se différencier en différents types cellulaires. Les études réalisées fin 1990-début 2000 suggéraient que les MPP se différenciaient en progéniteur lymphoïde commun (CLP ; qui se différencieront en cellules lymphoïdes matures principalement) ou en progéniteur myéloïde commun (CMP). Les CMP semblaient pouvoir ensuite se différencier en progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP ; qui génèrent des globules rouges et des mégacaryocytes) ou en progéniteur granulo-macrophagique (GMP ; qui génèrent des polynucléaires, des monocytes et des cellules dendritiques).¹¹ Ce schéma de différenciation a été remis en question à la fin des années 2000 lorsque plusieurs équipes ont montré que les MPP se différencient en progéniteur à potentialité érythro-mégacaryocytaire ou en progéniteur lympho-myéloïde (« lymphoid-primed multipotent progenitor » ; LMPP) dénué de potentialité érythro-mégacaryocytaire.¹²⁻¹⁵

Comme les CSH, les MPP se sont avérées beaucoup plus hétérogènes que prévu d'un point de vue fonctionnel et la proportion de chacune des populations de MPP est fluctuante en fonction des besoins du moment (balance équilibrée entre progéniteurs multipotents à tendance érythro-mégacaryocytaire (MPP2), myéloïde (MPP3) et lymphoïde (MPP4)).¹⁶ L'avènement des techniques de séquençage de l'ARN à l'échelle unicellulaire a permis de montrer le caractère très hétérogène de cette population et accru le nombre de populations identifiables au sein des progéniteurs multipotents. On admet aujourd'hui que les cellules de chacune de ces populations ne présentent pas, en l'absence de stress, un potentiel de différenciation mixte mais qu'elles gardent une certaine plasticité leur permettant de changer de voie de différenciation en situation de stress.^{17,18}

1.3.2. Régulation de la sélection d'un lignage

La manière dont une CSH opte pour la différenciation vers un lignage plutôt qu'un autre reste controversée. Deux modèles principaux ont émergé pour expliquer ce choix : le modèle déterministe donne un rôle essentiel aux facteurs intrinsèques, génétiques et épigénétiques, et aux stimuli extrinsèques qui déterminent ensemble, par un équivalent d'effet on/off, la voie de différenciation qui s'applique ; le modèle stochastique, actuellement préféré, donne une place prépondérante au hasard dans la sélection du lignage qui repose sur une combinaison de paramètres n'ayant qu'un rôle permissif.^{19,20}

Quelque-soit le modèle, le processus de différenciation et de sélection d'un lignage est complexe et fait intervenir de multiples acteurs. Parmi les facteurs intrinsèques, certains facteurs de transcription sont clairement associés à l'orientation des cellules vers un lignage. GATA-1, par exemple, est essentiel au cours de la différenciation érythroïde et mégacaryocytaire, tandis que PU.1 et CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α) favorisent la différenciation myéloïde. Parmi les facteurs extrinsèques, les cytokines hématopoïétiques jouent un rôle important dans les étapes précoces [SCF (ligand de KIT), IL-3 et FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3)] comme dans les étapes tardives [CSF1 (M-CSF), CSF2 (GM-CSF) et CSF3 (G-CSF) dans la différenciation en monocyte-macrophage et en polynucléaire neutrophile, érythropoïétine (EPO) dans la différenciation érythrocytaire, thrombopoïétine (TPO) dans la différenciation mégacaryocytaire].

Il a été proposé récemment que l'hématopoïèse est un processus moins structuré dans l'espace qu'un épithélium. De ce fait, les facteurs intrinsèques, en particulier épigénétiques, seraient particulièrement importants dans la différenciation hématopoïétique. L'activité des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation est régulée par la méthylation des résidus cytosine, notamment au niveau des dinucléotides CpG des sites d'initiation de la transcription. L'excès de méthylation étant responsable d'une répression de la transcription, des différences dans la richesse en CpG des motifs de liaison à l'ADN au niveau des enhanceurs des facteurs de transcription clés de la différenciation myéloïde pourraient expliquer que la délétion du gène *Tet2* (hyperméthylation focalisée du génome), qui code une enzyme catalysant la déméthylation des cytosines, favorise la différenciation myélomonocytaire aux dépens de la différenciation érythroïde alors que celle de *Dnmt3a* (déméthylation globale du génome), qui code une DNA méthyltransférase catalysant la méthylation des cytosines, a un effet inverse sur le biais de lignage.²¹

En résumé, chaque étape du processus de différenciation, unidirectionnel et définitif, restreint le potentiel de la cellule. Les progéniteurs multipotents gardent une certaine plasticité afin de s'adapter au stress. Le choix de lignage reste controversé, entre modèle déterministe et stochastique, et fait intervenir des facteurs de transcription et des cytokines dans un contexte épigénétique adapté.

1.4. Mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est le processus permettant la génération de mégacaryocytes et la plaquettogénèse est le processus de production des plaquettes à partir du mégacaryocyte. Les mégacaryocytes sont des cellules de grande taille (50 à 100µM chez l'homme) qui ont la particularité (rare) d'être polyploïdes (elles possèdent plus de 2N chromosomes). Elles résident majoritairement dans la moelle osseuse et la production de plaquettes est leur principale fonction : un mégacaryocyte mature a une durée de vie très limitée dans le temps lorsqu'il devient plaquetto-gène. Nous avons indiqué plus haut que ces cellules sont aussi une des composantes cellulaires importantes de la niche hématopoïétique, modulant le comportement de la CSH par les cytokines (TGFβ, PF4, TPO, CXCL4) qu'elle produit.

1.4.1. *De la CSH au progéniteur mégacaryocytaire*

Selon le schéma classique de l'hématopoïèse, la CSH se différencie en MPP puis en CMP qui, à son tour, se différencie en MEP puis en progéniteur mégacaryocytaire (MKP, présentant les marqueurs Lin⁻, Sca⁻, Kit⁺, CD41⁺, CD150⁺) pour aboutir à un mégacaryocyte immature. Cependant, et nous l'avons déjà évoqué, ce schéma de différenciation a été remis en cause et les voies menant à la production de mégacaryocytes s'avèrent multiples.²²

Une partie des CSH semble orientée d'emblée vers la différenciation mégacaryocytaire : 10% des CSH expriment l'antigène de surface CD41 (intégrine α-IIb codée par *ITGA2B*), caractéristique de cette lignée cellulaire.⁷ Plus net encore, 50% des CSH expriment le marqueur facteur von Willebrand (classiquement exprimé par les mégacaryocytes) et possèdent un biais de reconstitution, après transplantation, vers le lignage plaquettaire et myéloïde, aux dépens du lignage lymphoïde.⁸ Les études à l'échelle unicellulaire ont confirmé qu'il existe des CSH biaisées vers le lignage mégacaryocytaire ; ces cellules gardent des propriétés d'autorenouvellement tandis que la perte de leur caractère multipotent est controversée.^{9,23} Certaines équipes estiment que ces cellules sont capables de générer des mégacaryocytes sans passer par les étapes classiques de la différenciation mégacaryocytaire.²⁴ En cas d'inflammation ou au cours du vieillissement chez la souris, l'expression des marqueurs du lignage mégacaryocytaire (CD41, CD61, FvW, CXCL4) à la surface des CSH est augmentée.²⁵⁻²⁷ La mégacaryopoïèse pourrait donc utiliser des voies différentes en fonction du contexte.

Un autre sujet de controverse est le moment où les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires se différencient des progéniteurs lymphoïdes. Classiquement, la population cellulaire de type MPP se différencie en CLP ou en CMP, cette dernière population pouvant donner naissance aux MEP. Mais certains travaux suggèrent que le MEP apparaît avant l'émergence d'un progéniteur à potentialité lympho-myéloïde, ce qui ferait de la différenciation érythro-mégacaryocytaire l'un des premiers embranchements de la différenciation hématopoïétique.¹²

Les études clonogéniques initiales suggéraient que les MEP (classiquement la population Lin⁻, Sca⁻, Kit⁺, CD34⁻, FcγR^{faible}) étaient une population homogène de cellules à double potentialité, capables de se différencier en proportions égales en progéniteurs érythroïdes, mégacaryocytaires ou mixtes.¹¹ Le rôle partagé des facteurs de transcription GATA1, GATA2, FOG, TAL1 et NFE2 dans l'érythropoïèse et la mégacaryopoïèse (et les défauts communs observés en cas d'anomalie d'expression de ces facteurs) apportait des arguments supplémentaires à l'existence d'un précurseur commun à ces deux voies. Des études plus récentes suggèrent que la population MEP contient 1) des progéniteurs à potentialité érythro-mégacaryocytaire avec persistance d'un potentiel myéloïde (Pre-MEP CD71⁻, CD41⁻), 2) des progéniteurs à potentialité érythroïde (E-MEP CD71⁺, CD41⁻) et 3) une population nettement minoritaire de progéniteurs se différenciant uniquement en mégacaryocytes (MK-MEP CD71⁺, CD41⁺).²⁸ Une autre étude minimise le rôle du progéniteur bi-potent MEP dans la génération des mégacaryocytes au profit d'un progéniteur à potentiel mégacaryocytaire unique identifié au sein de la population CMP (CD34⁺, CD38⁺, CD45RA⁻, CD123^{faible}) à l'aide du marqueur CD41.²⁹

1.4.2. Maturation du mégacaryocyte

Lors de la maturation mégacaryocytaire, qui dure approximativement 8 jours chez l'homme, la taille de la cellule augmente avec sa polyploïdisation qui implique un processus d'endomitose. Dans un second temps, de multiples granules cytoplasmiques, et un système complexe de membranes plasmiques dites de démarcation, apparaissent.

1.4.2.1. Régulation de la mégacaryopoïèse par l'axe TPO/MPL

Le régulateur humoral principal de la mégacaryopoïèse est la thrombopoïétine (TPO) dont le récepteur c-MPL (MPL) est spécifique de la lignée mégacaryocytaire.³⁰ Les modèles murins de délétion du gène *Tpo* ou du gène *Mpl* ont une thrombopénie profonde (réduction de 90% du taux de plaquettes), en lien avec une réduction du nombre des progéniteurs mégacaryocytaires et des mégacaryocytes matures.³¹ A l'inverse, les modèles transgéniques dans lesquels le gène *Tpo* est surexprimé dans les cellules hématopoïétiques acquièrent un phénotype thrombocythémique avec hyperplasie mégacaryocytaire.³² La TPO est essentielle à la prolifération et à la maturation mégacaryocytaire, en particulier la polyploïdisation, mais pas à la formation des proplaquettes. MPL est exprimé à la surface de certaines CSH et donne un rôle important à la TPO dans la balance quiescence/prolifération des CSH, comme en attestent les études sur les souris *Mpl* ou *Tpo* KO.^{33,34}

La TPO est principalement produite par le foie et sa concentration plasmatique est finement régulée par sa captation par le récepteur MPL présent sur les plaquettes. Le système TPO/MPL constitue donc une boucle d'auto-régulation du taux plasmatique de TPO, expliquant sa corrélation inverse au taux de plaquettes.³⁵ Il existe des systèmes de régulation positive de la synthèse de TPO par le foie. Par exemple, en cas d'inflammation, l'IL-6 induit la synthèse de TPO par les hépatocytes. L'IL-3 et l'IL1-β induisent aussi la production de TPO. Récemment, une boucle de régulation de la synthèse de TPO a été décrite : les plaquettes « vieillissantes », désialylées, sont captées par le récepteur Ashwell-Morell des hépatocytes, ce qui induit la synthèse de TPO par ces cellules.³⁶ En dehors des hépatocytes, d'autres cellules synthétisent la TPO, en particulier certaines cellules stromales mésenchymateuses.³⁷

MPL est un récepteur de cytokine sans activité kinase intrinsèque. La fixation de la TPO sur le domaine extra-membranaire de MPL induit la dimérisation de ce récepteur. Cette dimérisation du récepteur permet à chacune des protéines kinases cytoplasmiques JAK2 (fixées sur la région membranaire proximale du domaine cytoplasmique de chaque dimère MPL) de phosphoryler l'autre protéine JAK2 (« cross phosphorylation ») ainsi que la région membranaire distale du domaine cytoplasmique de MPL (en particulier les résidus tyrosine 625 et 630).³⁸ Lorsqu'ils sont phosphorylés, ces résidus servent de site de liaison à des protéines de signalisation contenant un domaine src homology 2 (SH2) qui sont à leur tour phosphorylées par JAK2.

Ce mécanisme active des cascades de signalisation, en particulier les voies STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), PI3K/Akt (Phosphatidylinositol-kinase de type 3), RAS / MAPK (Mitogen-activated protein kinases) / ERK1-2 (Extracellular signal-regulated kinases) et mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie et la différenciation.³⁹⁻⁴² JAK2 phosphoryle plusieurs membres de la famille STAT (STAT1, STAT3, STAT5a et STAT5b).^{43,44} Les protéines STAT phosphorylées se dimérisent et migrent dans le noyau, reconnaissent certains sites de transcription qui leur sont spécifiques, et induisent la transcription de gènes tels que *P21*, *BCLXL* et *CCND1* codant la cycline D1.

Une signalisation de MPL indépendante de JAK2 existe aussi. Elle implique la tyrosine phosphatase SHP2 (également appelée PTPN11) : les mégacaryocytes des souris *Shp2* knockout présentent un défaut de ploïdisation. Elle implique aussi TYK2, une tyrosine kinase appartenant à la famille JAK, dont le rôle n'est toutefois pas essentiel.^{38,45,46}

Une signalisation persistante étant délétère, des mécanismes régulateurs négatifs de la signalisation induite par MPL ont été identifiés :

- Ubiquitination de lysines du domaine intracellulaire de MPL par l'enzyme E3 ubiquitine ligase CBL, induisant l'internalisation et la dégradation de MPL dans les lysosomes et par le protéasome.^{47,48} Il a d'ailleurs été récemment démontré qu'une délétion de c-Cbl dans le lignage plaquettaire était responsable d'une sévère microthrombocytose en lien avec des défauts d'internalisation de MPL.⁴⁹
- Recrutement de phosphatases qui induisent la déphosphorylation de JAK2 comme PTPN1, PTPN2 et possiblement la phosphatase transmembranaire CD45.^{50,51}
- Recrutement de régulateurs négatifs de la signalisation en aval de JAK2, en particulier certaines protéines de la famille SOCS (suppressor of cytokine signaling protein 1) comme SOCS-1 et SOCS-3 qui se fixent à JAK2 ou sur les résidus tyrosine phosphorylés de MPL.⁵² De manière surprenante, l'activation d'une protéine SOCS par un récepteur de cytokine autre que MPL induit également une diminution de la signalisation de MPL : c'est le cas de l'activation du récepteur de l'IFN- α , ce qui explique la thrombopénie observée chez des patients traités par cette cytokine.⁵² LNK, aussi appelée SH2B3, est une protéine adaptatrice qui peut aussi se lier à JAK2 (par son domaine SH2) pour inhiber son activité.⁵³
- Interaction des membres de la famille STAT avec des membres de la famille des protéines inhibitrices des STAT (PIAS, Protein Inhibitor of Activated STAT)

La persistance d'une production plaquettaire minime dans les modèles murins de délétion du gène *Tpo* ou du gène *Mpl* ainsi que chez les patients présentant une perte d'expression de MPL suggère que d'autres molécules peuvent promouvoir la génération des mégacaryocytes et des plaquettes.

L'activation de la voie de signalisation NOTCH induit chez la CSH un biais vers la différenciation mégacaryocytaire mais les étapes finales de la différenciation mégacaryocytaire ne semblent pas engagées.⁵⁴ La cytokine IGF-1 (insulin-like growth factor-1 ou somatomédine C) induit la différenciation des cellules CD34⁺ en mégacaryocytes et la formation de proplaquettes en l'absence de TPO.⁵⁵ La chemokine CCL5 (C-C Motif Chemokine Ligand 5) favorise la ploïdisation mégacaryocytaire et la formation de proplaquettes. Enfin, l'IL-1 α promeut, de manière indépendante de MPL, la fragmentation des proplaquettes dans la moelle osseuse.⁵⁶

1.4.2.2. Le rôle des facteurs de transcription RUNX1, GATA1 et Fli-1 dans la mégacaryopoïèse

Différents facteurs de transcription guident la maturation mégacaryocytaire en fonction de leur niveau d'expression à un moment donné de la maturation.

L'expression des facteurs de transcription GATA1 ou PU.1 détermine si la cellule au stade CMP se différencie en progéniteur myéloïde (expression de PU.1) ou érythro-mégacaryocytaire MEP (expression de GATA-1). Le MEP exprime alors divers facteurs de transcription : NF-E2, SCL, GFI1B, GATA1, GATA2, KLF1 et ETV6.^{13,57,58}

Au cours de l'étape suivante, la différenciation en progéniteur mégacaryocytaire se réalise si les facteurs FLI1, RUNX1 et GATA2 sont exprimés tandis que la différenciation en progéniteur érythroïde se réalise si les facteurs EKLF, c-Myb et GATA1 sont préférentiellement exprimés.⁵⁹⁻⁶¹ Cette représentation reste schématique, puisque l'expression de GATA1, par exemple, reste essentielle à la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires et à l'expression de protéines du lignage mégacaryocytaire, en l'occurrence CD41.⁶²

Au cours des étapes plus tardives de maturation mégacaryocytaire, le facteur de transcription RUNX1 inhibe l'expression de MYH10 et Notch4 mais, dans le même temps, induit l'expression de MYL9 permettant les modifications de cytosquelette nécessaires à la polyploïdisation.^{63,64} Le facteur de transcription FLI1 va réguler l'expression du CD42a et CD42b tandis que NF-E2 est impliqué dans la production de proplaquettes et la libération des plaquettes.^{65,66}

Des mutations de GATA1, RUNX1, FLI1, GFI1b et ETV6 ont été décrites chez des patients avec thrombopénie d'origine familiale soulignant le rôle essentiel de ces facteurs de transcription dans la mégacaryopoïèse.

1.4.2.3. Polyploïdie puis système de membrane de démarcation et granules : des marqueurs de maturation mégacaryocytaire

Après un certain nombre de mitoses, les progéniteurs mégacaryocytaires expriment les glycoprotéines de surface de la lignée plaquettaire GpIb (CD42), GpIIb (CD41) et GpIIIa (CD61) et initient un processus de polyploïdisation, dépendant de la TPO, permettant au mégacaryocyte de réaliser des cycles de duplication de l'ADN sans mitose. Ce processus s'effectue principalement par endomitose, un processus qui diffère de l'endoréplication par l'entrée en mitose sans aller jusqu'à la cytokinèse : le mégacaryocyte en devenir subit toutes les étapes de la mitose sans la télophase et la cytokinèse. Au fur et à mesure des endomitoses, le mégacaryocyte accumule du matériel génétique à

hauteur de 4n, 8n, 16n, 32n, 64n voire 128n avant de terminer sa maturation et de former des proplaquettes. La ploïdie modale mégacaryocytaire est de 16n chez l'homme et la souris, ce qui permet une production très importante d'ARNm et de protéines nécessaire à la production des plaquettes. On note toutefois que la polyploïdisation des mégacaryocytes n'est pas indispensable à la différenciation terminale des mégacaryocytes, certains mégacaryocytes à 2n ou 4n (micromégacaryocytes) étant parfaitement à même de générer des plaquettes (dans une moindre quantité).

Après la phase d'endomitose (et à partir du stade 8n), se déroule une étape de maturation cytoplasmique où se mettent en place les membranes de démarcation. Ces membranes correspondent à des invaginations de la membrane plasmique des mégacaryocytes et permettent de former les proplaquettes. Leur formation implique un réseau d'actine contrôlé par la voie WASp/WAVE. Durant cette phase post-répllicative, le cytoplasme des mégacaryocytes s'enrichit aussi en granules qui sont les granules α (les plus abondantes, contenant des centaines de protéines différentes dont CXCL4, le facteur von Willebrand et le TGF- β 1), les granules denses δ (contenant des transporteurs membranaires, de fortes concentrations de calcium, des nucléotides adénine et des polyphosphates), des granules T (contenant la protéine TLR-9 et la protéine disulfide isomérase) et les granules λ correspondant aux lysosomes contenant des hydrolases dégradant les protéines, les lipides et les sucres.

1.4.3. Propriétés et fonctions du mégacaryocyte

1.4.3.1. Production des plaquettes

Afin de produire les plaquettes, les mégacaryocytes se fragmentent en formant de longues extensions membranaires tubulaires (appelées proplaquettes) qui passent à travers l'endothélium vasculaire pour être fragmentées en plaquettes dans la circulation sanguine. La formation des proplaquettes est dépendante des microtubules d' $\alpha\beta$ -tubuline, du cytosquelette d'actine et des voies de signalisation impliquant les Rho GTPase (RhoA en particulier) et la protéine kinase C (PKC). La formation des proplaquettes pourrait être déclenchée par un phénomène pseudo-apoptotique impliquant l'activation de la caspase-3.⁶⁷

Les plaquettes, issues du fractionnement des proplaquettes ayant traversé la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins sinusoïdaux de la moelle sont libérées dans la circulation sanguine. Un autre « site de largage » des plaquettes serait la circulation artérielle pulmonaire (après migration sanguine des mégacaryocytes). Quel que soit la localisation de leur production, les plaquettes jouent un rôle majeur dans l'hémostase humaine en créant une barrière physique via leur agrégation afin d'éviter les pertes sanguines.

On estime qu'un mégacaryocyte permet la production de 1000 à 3000 plaquettes. Après formation de proplaquettes, le mégacaryocyte, qui n'est plus constitué que d'un noyau, entre dans une phase de sénescence et il est phagocyté par un macrophage.

1.4.3.2. Rôle du mégacaryocyte sur la CSH et la niche hématopoïétique

Si la fonction principale du mégacaryocyte est de produire des plaquettes pour assurer l'hémostase, il interagit également avec la CSH et la niche hématopoïétique.

Une partie des CSH est en effet plus souvent en contact avec les mégacaryocytes que ne le voudrait le hasard. D'autre part, la déplétion des mégacaryocytes *in vivo* via un modèle murin transgénique CXCL4^{-/-} induit une prolifération des CSH. Cette interaction mégacaryocyte-CSH est régulée par la chémokine CXCL4 sécrétée par les mégacaryocytes qui induit la mise en quiescence de la CSH.⁶⁸ Les mégacaryocytes régulent aussi la quiescence des CSH en sécrétant du TGFβ et leur récupération après chimiothérapie par sécrétion de FGF1.⁶⁹

En outre, l'analyse des souris dans lesquelles le gène *Nfe2* a été supprimé suggère que les mégacaryocytes jouent un rôle dans la prolifération ostéoblastique, ce qui implique la synthèse de PDGF-BB.^{70,71} Les mégacaryocytes produisent également une partie des composants de la matrice extra-cellulaire du micro-environnement médullaire à savoir la fibronectine, le collagène de type IV et la laminine.⁷²

En résumé, les mégacaryocytes résident majoritairement dans la moelle osseuse, produisent les plaquettes et modulent le comportement des CSH dans la niche. Une partie des CSH semble orientée vers la différenciation mégacaryocytaire en gardant des propriétés d'autorenouvellement et la mégacaryopoïèse utilise des voies différentes en fonction du contexte, homéostasie ou stress. La maturation mégacaryocytaire dure approximativement 8 jours. Le régulateur principal est la TPO produite par le foie. Son récepteur MPL signale essentiellement via JAK2 et les facteurs de transcription GATA1 et RUNX1 jouent un rôle décisif. Le mégacaryocyte en devenir subit toutes les étapes de la mitose sans télophase ni cytokinèse, ce qui provoque une ploïdisation dont le mode dominant est 16n. Son cytoplasme génère des proplaquettes qui passent à travers l'endothélium vasculaire pour être fragmentées en plaquettes dans la circulation sanguine

2. NEOPLASMES MYELOPROLIFÉRATIFS

2.1. Généralités et classification des néoplasmes myéloprolifératifs

2.1.1. Définitions et généralités sur les hémopathies malignes

Les hémopathies malignes regroupent un ensemble de pathologies du système hématopoïétique dont l'expression clinique et biologique aussi bien que l'évolution sont très hétérogènes. Il s'agit de maladies clonales attribuées à l'acquisition de mutation somatiques dans une CSH, plus rarement dans un progéniteur très précoce, voire (en ce qui concerne certaines hémopathies lymphoïdes) dans un lymphocyte en cours de maturation. Les cellules qui dérivent de cette cellule mutée présentent des altérations de leur différenciation, de leur prolifération et de leurs fonctions.

Des efforts constants depuis plusieurs décennies ont permis (et permettent encore) de mieux caractériser ces hémopathies malignes. Leur identification s'est d'abord appuyée sur une analyse morphologique (cytologique et anatomopathologique), secondairement renforcée par une analyse cytogénétique (avec l'avènement du caryotype et la découverte du chromosome Philadelphie par Peter Nowell dans les années 1960), phénotypique (avec la mise au point des anticorps monoclonaux par Georges Kohler et Cesar Milstein dans les années 1970), puis moléculaire (avec l'avènement des notions d'oncogène et de gène suppresseur de tumeur dans la même décennie). L'avènement des technologies de séquençage de l'ADN au début des années 2000 a permis une caractérisation extensive des altérations somatiques des régions codantes de l'ADN qui caractérisent les tumeurs humaines, en particulier les hémopathies. L'identification de ces altérations a guidé la dernière

itération de la classification des hémopathies malignes proposée en 2016 sous l'égide de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS).⁷³

Les hémopathies sont classées de longue date en hémopathies lymphoïdes et myéloïdes. Parmi les hémopathies lymphoïdes, on distingue les néoplasmes à cellule lymphoïde B mature (comprenant la majorité des lymphomes et le myélome), les néoplasmes à cellule T ou NK mature, la maladie de Hodgkin, les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation et les néoplasmes à cellule dendritique et histiocytaire.⁷⁴ Les hémopathies myéloïdes regroupent les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et néoplasmes associés, les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP), les syndromes myélodysplasiques, les syndromes mixtes (syndromes myélodysplasiques/ néoplasmes myéloprolifératifs), les mastocytoses, et les néoplasmes myéloïdes/lymphoïdes avec éosinophilie et réarrangement PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1 ou avec PCM1-JAK2.⁷⁵

2.1.2. Les différentes entités de néoplasmes myéloprolifératifs

Au sein des NMP, la classification OMS distingue plusieurs entités :

- La leucémie myéloïde chronique (LMC), caractérisée par le réarrangement BCR-ABL1.
- La leucémie chronique à neutrophile (LCN), fréquemment associée à une mutation de *CSF3R*, le gène récepteur de CSF3 (anciennement G-CSF).
- La thrombocythémie essentielle (TE).
- La polyglobulie de Vaquez (PV).
- La myélofibrose primitive (PMF).
- Les leucémies chroniques à éosinophiles.
- Les NMP non classables.

2.1.2.1. Thrombocythémie essentielle

La TE est un NMP caractérisé par une augmentation du nombre des plaquettes sanguines, découverte le plus souvent fortuite. Son incidence est estimée entre 1.2 et 3 personne pour 100.000 par an et il s'agit du plus fréquent des NMP non BCR-ABL1. La fréquence de cette pathologie augmente avec l'âge (la médiane de l'âge au diagnostic est 58 ans) mais elle peut être identifiée chez des sujets jeunes. La TE affecte plus souvent les femmes que les hommes. Lorsque le diagnostic n'est pas fortuit, les symptômes les plus fréquemment retrouvés sont des céphalées et des troubles visuels. Plus rarement, la maladie est révélée par une érythromélgie, un événement thrombotique aigu artériel ou veineux, voire un épisode hémorragique. Une splénomélgie est possible.

Les critères diagnostiques majeurs de la TE actualisés par l'OMS en 2016 sont :

- Un taux de plaquettes dans le sang périphérique ≥ 450 G/L,
- Une biopsie médullaire montrant une prolifération cellulaire prédominant sur la lignée mégacaryocytaire avec une augmentation du nombre de mégacaryocytes matures de grande taille avec un noyau hyperlobé. La biopsie ne doit pas montrer d'augmentation significative de la granulopoïèse neutrophile ou de l'érythroïèse, et la fibrose réticulinique, si elle existe, ne doit pas dépasser le grade 1.
- Absence des critères diagnostiques de la LMC, de la PV, de la MFP, d'un syndrome myélodysplasique ou d'un autre néoplasme myéloïde.
- Présence d'une mutation du gène *JAK2*, *CALR* ou *MPL*.

La présence d'un autre marqueur de clonalité et l'absence de cause évidente de thrombocytose réactionnelle sont considérés comme des critères mineurs du diagnostic de TE. A l'aune de ces critères, le diagnostic de TE est retenu sur l'association des 4 critères majeurs ou la présence des 3 premiers critères majeurs associés aux critères mineurs.⁷⁵

La survie des patients atteints de TE est inférieure à celle de la population générale de même âge (survie médiane de 20 ans).⁷⁶ Le principal risque à court et long terme chez les patients atteints de TE demeure la thrombose veineuse ou artérielle : un antécédent de thrombose est retrouvé chez près de 20% des patients au diagnostic et, après un suivi médian de 6 ans, l'incidence des thromboses artérielles ou veineuses était de 12% dans une cohorte de 891 patients.⁷⁷ Le risque de thrombose est associé à l'âge (>60 ans), aux antécédents de première thrombose, à la présence de facteurs de risque cardiovasculaires, à une hyperleucocytose et à la présence de la mutation JAK2 V617F (le risque est moindre avec la mutation CALR).⁷⁸

Une évolution de la TE en PV est possible mais semble rare (<5% des patients après 10 ans d'évolution).⁷⁶ Les autres risques évolutifs de la TE sont la myélofibrose secondaire et la transformation en LAM. Ils seront abordés plus loin.

2.1.2.2. Polyglobulie de Vaquez

La PV est un NMP qui provoque un excès de globules rouges dans le sang (on parle de polyglobulie). Parfois découverte fortuitement, la PV est plus bruyante que la TE et peut induire une érythrose faciale, des signes d'hyperviscosité sanguine (céphalées, vertiges, acouphènes, myodésopsies, hypertension artérielle), une érythromélgie ou un prurit (notamment aquagénique). La splénomégalie est plus fréquente que chez les patients atteints de TE.

Les critères diagnostiques majeurs de l'OMS sont depuis 2016 :

- Dans le sang, un taux d'hémoglobine >16.5g/dL chez l'homme ou >16g/dL chez la femme (ou un hémocrite >49% chez l'homme et >48% chez la femme ; ou une masse sanguine >125%).
- Dans la moelle, une hypercellularité pour l'âge avec hyperplasie des 3 lignées (granuleuse, érythroïde et mégacaryocytaire), visible sur une biopsie ostéo-médullaire qui montre des mégacaryocytes souvent hétérogènes.
- La présence d'une mutation JAK2 V617F ou d'une mutation de l'exon 12 de JAK2 dans les cellules sanguines (Contrairement aux TE, on ne détecte pas de mutation de MPL ou de CALR dans les PV).

Le diagnostic peut également être retenu en l'absence de mutation de JAK2 si les 2 premiers critères majeurs sont respectés associé à un taux sérique de l'EPO sub-normal.⁷⁵

La survie médiane des patients atteints de PV est de l'ordre de 15 ans. Le risque thrombotique, plus élevé qu'en cas de TE, est la principale préoccupation clinique puisqu'une thrombose est responsable du décès de près de 40% des patients.⁷⁹ De nombreux patients ont présenté une thrombose artérielle (15%) ou veineuse (7%) avant le diagnostic. L'incidence des thromboses après le diagnostic est estimée à 5.5 pour 100 patients/an.^{79,80} On distingue des patients à faible risque (âge <60 ans et absence d'antécédent thrombotique) et des patients à haut risque (âge >60 ans ou antécédent thrombotique) de thrombose.

Les autres risques évolutifs de la PV sont, comme la TE, la myélofibrose secondaire et la transformation en LAM. Ils seront abordés plus loin.

2.1.2.3. Myélofibrose primitive

La myélofibrose (MF), qu'elle soit primitive ou secondaire à l'évolution d'une TE ou d'une PV, est un NMP caractérisé par une fibrose réticulinique puis collagène de la moelle osseuse. Cette fibrose aboutit à une destruction du tissu de soutien de la moelle osseuse associée à une relocalisation imparfaite du tissu hématopoïétique, principalement dans la rate (hématopoïèse extra-médullaire).

Touchant préférentiellement les hommes avec une médiane d'âge de 62 ans, la MF est une pathologie nettement plus grave que la TE et la PV.

La maladie est souvent symptomatique et révélée par une altération de l'état général (asthénie, fièvre, sueurs nocturnes) et des douleurs spléniques (en lien avec une volumineuse splénomégalie). A l'inverse de la TE ou de la PV où les plaquettes et/ou le taux de globule rouge sont élevés, il existe fréquemment des signes d'insuffisance médullaire (anémie, thrombopénie) en lien avec la destruction du tissu de soutien médullaire.

Le diagnostic de MF requiert 3 critères majeurs :⁷⁵

- Dans la moelle : prolifération mégacaryocytaire avec atypies, accompagnée d'une fibrose réticulinique et/ou collagène de grade 2 ou 3.
- Absence de critères en faveur d'une autre pathologie telle que PV, TE, LMC, myélodysplasie ou une autre hémopathie myéloïde.
- Présence d'une mutation de *JAK2*, de *CALR* ou de *MPL* (en l'absence d'une de ces trois mutations, un argument de clonalité doit être présent ainsi que l'absence d'argument pour une fibrose médullaire réactionnelle).

Le diagnostic de MF requiert en outre au moins un critère mineur :

- Anémie non attribuable à une autre comorbidité.
- Hyperleucocytose ≥ 11 G/L.
- Splénomégalie palpable.
- LDH augmentées (supérieures à la norme du laboratoire).
- Erythro-myélémie (présence quantifiable de progéniteurs érythroïdes ou granuleux sur le frottis sanguin).

La découverte d'une fibrose médullaire impose d'éliminer une cause infectieuse, inflammatoire ou auto-immune, une exposition toxique, certaines hémopathies lymphoïdes (notamment la leucémie à tricholeucocytes), et des métastases osseuses d'une tumeur solide.

L'OMS ajoute désormais à la MF « manifeste » répondant aux critères ci-dessus, des formes pré-fibrotiques (pré-MF) dans lesquelles la fibrose médullaire est de grade 1 et l'érythro-myélémie n'est pas un critère mineur. Cette entité est difficile à distinguer d'une TE.

Le risque de thrombose chez les patients MF est supérieur à celui de la population générale. Cependant, à l'inverse de la TE et la PV, ce n'est pas la première préoccupation clinique : l'incidence de décès par thrombose n'est que de 1.7 pour 100 patients/an.⁸¹ Le mauvais pronostic de la MF, comparée à la TE et à la PV, est dû au risque de transformation en LAM (33% des causes de décès

rapporté ; responsable de 7.7 décès pour 100 patients/an) et aux conséquences des cytopénies sévères. La survie médiane est estimée à 6 ans.⁸²

Une autre caractéristique de la MF est la présence fréquente, en association avec la mutation de *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, d'autres mutations somatiques, ce que l'on n'observe beaucoup moins dans la TE ou la PV.

En résumé, les NPM auxquels nous nous intéressons sont les NMP dits « classiques » hors LMC, c'est-à-dire la TE caractérisée par une augmentation du nombre de plaquettes dans le sang périphérique en raison d'une mutation du gène *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, la PV caractérisée par une augmentation de l'hématocrite et du taux d'hémoglobine en raison d'une mutation du gène *JAK2*, et la MF qui peut être primitive ou secondaire à l'évolution d'une TE ou d'une PV, se caractérisant par une fibrose réticulinique puis collagène de la moelle osseuse avec hématopoïèse extra-médullaire et associant souvent d'autres mutations somatiques aux mutations de *JAK2*, *CALR* ou *MPL*.

2.2. Caractéristiques biologiques des NMP

2.2.1. Caractéristiques phénotypiques communes des CSH et progéniteurs de NMP

Si la présentation clinique et biologique des NMP est hétérogène, ces maladies ont un certain nombre de caractéristiques communes qui les regroupent au sein d'une même entité.

Il s'agit de maladies clonales acquises dont la cellule d'origine est une CSH dans laquelle apparaissent un ou plusieurs évènements génétiques somatiques, qu'il s'agit d'un réarrangement chromosomique (LMC) ou de la mutation d'une région codante de l'ADN (PV, ET, MF). Cet évènement confère aux cellules filles un avantage compétitif sur les cellules non mutées. Cet avantage s'accroît au cours de la différenciation myéloïde de telle sorte que la plupart des cellules circulantes sont issues de la CSH mutée.⁸³⁻⁸⁵

L'avantage compétitif des cellules mutées lors de la différenciation est dû au fait que cette anomalie clonale confère à certains progéniteurs myéloïdes une hypersensibilité à une cytokine (EPO, TPO, G-CSF), provoquant une hyperactivation des voies de signalisation intracellulaires en aval du récepteur de cette cytokine. Cette hypersensibilité explique la prolifération cellulaire excessive des progéniteurs et précurseurs myéloïdes, conduisant à la production excessive de cellules matures d'un lignage (plaquettes dans la TE, globules rouges dans la PV, polynucléaires neutrophiles dans la LMC typique ou atypique). Contrairement à ce qui est observé dans une leucémie aiguë, la différenciation hématopoïétique n'est pas inhibée dans les NMPs.

L'hypersensibilité des progéniteurs à une cytokine s'explique très souvent par le fait que le principal évènement génétique somatique touche un gène codant une tyrosine kinase (*ABL1* dans la LMC (fusion des gènes *BCR* et *ABL1*), *PDGFRA* dans les leucémies chroniques à éosinophiles, *CSF3R* dans les leucémies chroniques à neutrophiles, *JAK2* dans les NMP classiques) ou un récepteur signalant via une tyrosine kinase (*MPL*, *CALR*). Ces anomalies sont en général responsables d'une activation dérégulée des voies de signalisation. Ces évènements génétiques qualifiés de « driver » reproduisent le phénotype de ces maladies chez la souris lorsqu'ils sont introduits dans les CSH murines.

La seule mutation d'une CSH ne suffit cependant pas à l'émergence de ces maladies puisque certaines de ces mutations, *JAK2* V617F par exemple, sont identifiées dans une fraction des cellules sanguines de sujets sans hémopathie (on parle d'hématopoïèse clonale de signification indéterminée).

Des travaux récents de modélisation ont bouleversé notre compréhension des NMP en démontrant que l'acquisition de la mutation JAK2 V617F survient très tôt au cours de la vie, sans doute avant la naissance, avec une expansion clonale très lente au cours de la vie, le délai moyen entre l'apparition de la mutation et la maladie étant évalué à 34 ans.⁸⁶ D'autres paramètres intrinsèques (comme une mutation supplémentaire ou un terrain génétique prédisposant) ou extrinsèques (comme un microenvironnement inflammatoire), voire l'association de ces deux conditions (boucles d'amplification entre cellules matures du clone et cellules souches et progénitrices, par exemple par l'intermédiaire de l'IL-6) sont probablement nécessaires au développement de la maladie.⁸⁷⁻⁹⁰

2.2.2. Mutations affectant la voie de signalisation JAK2-STAT dans les NMP (mutations « driver »)

2.2.2.1. Mutation JAK2 V617F

2.2.2.1.1. Propriétés normales de JAK2

En 2005, une mutation somatique récurrente du gène *JAK2* était découverte chez des patients atteints de NMP.⁹¹ Cette mutation somatique sur le nucléotide 1849 de l'exon 14 du gène *JAK2* (substituant une valine en phenylalanine du codon 617 de la protéine ; JAK2 V617F) est retrouvée chez près de 50-60% des TE et MF et 95% des PV.

Le gène *JAK2*, situé sur le chromosome 9 chez l'homme, code une tyrosine kinase intracellulaire qui est recrutée par un récepteur membranaire dénué d'activité tyrosine kinase (EPOR, MPL ou CSF3R) en réponse à la fixation de son ligand. Après fixation de la TPO sur MPL par exemple, la protéine JAK2 fixée sur la partie intra-cellulaire du dimère de récepteur, cross-phosphoryle la protéine JAK2 fixée sur l'autre dimère du récepteur et active des cascades de signalisation intracellulaire.

La protéine JAK2 joue un rôle un majeur dans l'hématopoïèse comme en attestent les modèles murins d'inactivation de *Jak2* où une mort à l'état embryonnaire est observée par absence d'érythropoïèse définitive (phénotype similaire à celui observé dans les souris *Epo* ou *Epor* KO).^{92,93}

La protéine JAK2 est constituée de 7 domaines homologues (JH1 à JH7 ; JH pour Janus Homology) :

- JH1 est le domaine C-terminal possédant l'activité tyrosine kinase. Ce domaine est activé après phosphorylation de la tyrosine 1007 située dans la boucle activatrice de la protéine.
- JH2 est le domaine « pseudo-kinase » car, bien que similaire à JH1, il est dépourvu d'activité tyrosine kinase ou doté d'une activité kinase faible. Le domaine pseudo-kinase stabilise le domaine kinase JH1 dans une conformation inactive.^{94,95}
- JH3 et JH4 sont des domaines SH2 qui interagissent avec d'autres molécules de voies de signalisation (STATs).
- JH5 à JH7 sont des domaines FERM en N-terminal, impliqués dans l'interaction avec le récepteur de cytokine.

JAK2 est impliquée dans la signalisation de nombreux récepteurs : récepteurs de type I homodimériques (EPOR, MPL, CSF3R) ou hétérodimériques (CSF2RA, IL-3RA, IL-5RA), récepteurs multimériques (IL-6R, IL-11R) et récepteurs de type II (récepteurs de l'IFN- γ).⁹²

2.2.2.1.2. La mutation JAK2 V617F : propriétés et conséquences biologiques

La mutation V617F est située dans le domaine pseudo-kinase JH2 de JAK2 et induit un changement conformationnel de l'hélice- α C du domaine pseudokinase, cette modification permettant le maintien à l'état actif du domaine kinase JH1.^{95,96} La protéine JAK2 V617F induit de manière constitutive les différentes voies de signalisation STAT, PI3K et MAPK. Cette activation peut être indépendante du ligand mais le récepteur de cytokine (ainsi que sa liaison avec les domaines FERM) est requis pour induire l'hyperactivité de JAK2 V617F.^{97,98} Parmi tous les récepteurs cytokiniques, MPL est celui qui semble essentiel au développement d'un NMP et à l'expansion du pool de CSH JAK2 V617F.⁹⁹

La mutation JAK2 V617F provoque une augmentation de l'ubiquitinylation et de la dégradation protéasomale de MPL, expliquant la diminution de l'expression du récepteur à la surface des mégacaryocytes des patients NMP (et des modèles murins Jak2V617F).¹⁰⁰

En dehors d'une hyperactivation des voies de signalisation, JAK2 V617F a un rôle épigénétique dans le noyau en phosphorylant la tyrosine 41 de l'histone H3 (diminuant alors la liaison de la protéine HP1 α à cette histone) et l'arginine méthyl transférase PRMT5.^{101,102}

2.2.2.1.3. Modèles murins Jak2 V617F

Différentes approches de modélisation de la mutation Jak2 V617F ont été réalisées chez la souris permettant de confirmer son rôle « driver » dans le phénotype NMP et de mieux comprendre ses propriétés et ses effets sur l'hématopoïèse.¹⁰³

Les premiers modèles murins ont été générés par transplantation de CSH de moelle osseuse de souris préalablement transduites avec un vecteur rétroviral pour introduire le gène *Jak2* sous sa forme mutée dans leur génome. Cette méthode présente l'avantage d'être rapidement mise en place. Elle présente toutefois plusieurs inconvénients : la séquence mutante est introduite dans toutes les cellules hématopoïétiques, de manière aléatoire dans le génome (interférant potentiellement avec les gènes dans lesquels elle est insérée), et elle est exprimée à des niveaux extrêmement élevés (sans rapport avec le niveau observé dans les cellules des patients). Ces modèles ont toutefois permis de montrer que Jak2 V617F reproduit le phénotype (plus particulièrement une polyglobulie avec MF secondaire) et induit la pousse de colonies érythroïdes indépendamment de la présence d'EPO.^{104,105} Dans ces modèles, il n'existe pas de thrombocytose.

La deuxième approche a été la création de modèles murins transgéniques. Le gène *JAK2* humain ou murin muté, placé sous le contrôle d'un promoteur spécifique, est introduit par micro-injection dans un œuf fécondé. Cette technique, plus lourde à mettre en œuvre, permet d'exprimer la mutation à un niveau plus physiologique, sous le contrôle d'un promoteur choisi, en limitant l'effet sur d'autres gènes. Les promoteurs les plus souvent utilisés afin que la mutation ne soit exprimée que dans les cellules du système hématopoïétique et dès le stade de CSH sont ceux des gènes *Vav* et *Scf*. Les modèles transgéniques Jak2 V617F (ou JAK2 V617F) générés présentent tous un phénotype de NMP avec hyperleucocytose à polynucléaires neutrophiles, splénomégalie avec hématopoïèse extra-médullaire, hyperplasie mégacaryocytaire et fibrose médullaire secondaire. Deux phénotypes sont observés en fonction du niveau d'expression de la mutation (par rapport à celle du gène *Jak2* sauvage) : une faible expression génère un phénotype TE tandis qu'une forte expression induit un phénotype PV (associé le plus souvent à une thrombocytose).^{106,107}

La troisième approche, plus récente et plus physiologique, est la génération de souris transgéniques de type Knock-In. Dans ces modèles, la construction génétique comportant le gène *Jak2* muté est intégrée dans le locus du gène *Jak2* endogène, permettant l'expression du gène muté sous le contrôle d'un promoteur endogène avec une expression physiologique de la mutation (i.e. dans les cellules qui expriment JAK2 au bon moment). De manière à rendre ce système encore plus contrôlable, la construction *Jak2* muté est flanquée de séquences LoxP de telle sorte qu'un croisement avec une souris exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur choisi permet d'exprimer le gène muté au moment choisi et dans les cellules choisies. L'utilisation de souris porteuses d'une construction Cre-ERT2 (par fusion d'un récepteur de l'oestradiol couplé à la séquence d'ADN codant la recombinaise Cre) permet d'induire la mutation en traitant les souris par le tamoxifène. L'utilisation des souris Mx1-Cre permet d'activer l'expression du gène muté par injection de polyinosinic:polycytidylic acid (pIpC). Les différents modèles KI *Jak2* V617F (hétérozygotes ou homozygotes) générés de cette façon présentent tous un phénotype NMP avec polyglobulie et splénomégalie (plus ou moins associés à une thrombocytose et une fibrose médullaire secondaire), phénotype retrouvé chez les souris receveuses après transplantation.¹⁰⁸⁻¹¹⁰ Ces modèles ont montré que la mutation *Jak2* V617F à l'état hétérozygote n'induit pas systématiquement un phénotype TE. De manière intrigante, le modèle murin KI JAK2 V617F (humain) ne présente, dans la majorité des cas, qu'un phénotype thrombocythémique, suggérant une activité kinase réduite.¹¹¹

2.2.2.1.4. Impact de JAK2 V617F sur le compartiment de CSH

Il existe de nombreux arguments permettant d'affirmer que, chez les patients atteints de NMP, la mutation JAK2 V617F est nécessairement présente dans une CSH :¹¹²

1) la mutation JAK2 V617F est détectable dans le compartiment cellulaire CD34+ CD38-, contenant les CSH de longue durée ;⁸⁵

2) La mutation est détectable dans toutes les cellules hématopoïétiques qu'une CSH peut engendrer par différenciation ;

3) Les études de xéno greffe de cellules de patients NMP dans des osselets humains générés chez des souris immunodéprimées ont montré que seule la population CD34+ CD38- permet de reconstituer une hématopoïèse JAK2 muté ;¹¹³

4) A partir d'un modèle murin knock-in *Jak2* V617F, seule la greffe de CSH mutées permet de maintenir un phénotype de NMP à long terme, ce qui n'est pas observé après greffe de progéniteurs mutés.¹¹⁴

S'il n'existe guère de doute sur l'existence (et la nécessité) d'une CSH JAK2 V617F mutée chez les patients NMP, les capacités conférées à la CSH par la seule mutation JAK2 V617F en terme d'avantage compétitif restent sujettes à discussion. La présence d'une mutation JAK2 V617F dans une CSH ne confère pas nécessairement un avantage compétitif à cette cellule. Elle ne suffit pas non plus à l'apparition d'un NMP comme l'atteste la découverte chez des sujets sains (majoritairement âgés) d'une hématopoïèse clonale de signification indéterminée JAK2 V617F (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential ; CHIP).⁸⁸ D'autres facteurs, tels certains traits génétiques, des mutations supplémentaires ou des facteurs extrinsèques, semblent nécessaires (ou favorisent) l'apparition d'un

phénotype NMP.¹¹⁵ Les résultats obtenus avec les modèles murins divergent. En terme d'avantage compétitif conféré par Jak2 V617F, ils suggèrent tous que cet avantage est associé au niveau d'expression de la mutation Jak2 V617F au sein des CSH : à expression faible, avantage compétitif faible ; à expression forte, avantage compétitif plus élevé.^{87,110,116} La corrélation entre gain de compétitivité et charge allélique JAK2 V617F pourrait expliquer que la xénogreffe de cellules CD34+ de patients MF soit plus facile que celle de cellules CD34+ de patients TE ou PV.¹¹⁷ Parmi les éléments responsables du gain de compétitivité conféré par la mutation JAK2 V617F, la cytokine TNF α joue un rôle important : Jak2 V617F induit la synthèse et l'expression de TNF α par les cellules matures du clone. Comme l'IL-6 dans la LMC, le TNF α promeut l'expansion d'une hématopoïèse JAK2 V617F au détriment d'une hématopoïèse JAK2 sauvage après greffe.^{118,119}

Les capacités d'autorenouvellement (et de persistance à long terme) des CSH, explorées chez la souris par des greffes sériées (et répétées au cours du vieillissement), semblent également dépendantes du niveau d'expression de Jak2 V617F : un haut niveau d'expression serait associé à un épuisement des CSH avec incapacité à reconstituer l'hématopoïèse sur le long terme.⁸⁷ Les mégacaryocytes porteurs de la mutation JAK2 V617F pourraient jouer un rôle protecteur des CSH en induisant leur mise en quiescence et en augmentant leur capacité de repopulation.^{120,121}

2.2.2.1.5. JAK2 V617F : une mutation et des phénotypes

Une CSH mutée JAK2 V617F a la capacité de se différencier en n'importe quelle cellule hématopoïétique mais la mutation ne donne un avantage sélectif que dans les lignages utilisant la kinase JAK2 et exprimant des récepteurs homodimériques de type I (EPOR, MPL et CSF3R), ce qui explique que le phénotype hématologique intéresse les lignages érythroïde, mégacaryocytaire et/ou granuleux.¹²²

Les mécanismes par lesquels une hématopoïèse JAK2 mutante sera à l'origine d'un phénotype à type d'hyperplasie mégacaryocytaire ou érythrocytaire restent controversés. L'une des explications (la moins discutable) est le rôle de la charge allélique JAK2 V617F puisque cette dernière est généralement basse en cas de TE (VAF \approx 25%), plus importante en cas de PV (VAF \approx 50%) et très élevée en cas de MF (VAF \approx 100%).¹⁰⁶ L'évolution d'une mutation JAK2 V617F de l'état hétérozygote vers l'état homozygote s'explique par une perte d'hétérozygotie du locus 9p sauvage au cours des recombinaisons mitotiques.¹²³

Une autre hypothèse est une différence de signalisation en aval de la protéine mutante ; schématiquement, l'activation des voies STAT3/STAT5 favoriserait une PV qui est inhibée par STAT1, l'activation de STAT1 favorise une TE, aucune de ces voies ne serait nécessaire à la MF. Les résultats des différentes études sont les suivants

- Les patients PV présentent une augmentation de l'expression de P-STAT3 et P-STAT5, tandis que les patients avec TE présentent une expression augmentée de P-STAT3 mais une diminution de P-STAT5 et les patients MF ont une diminution de P-STAT3 et P-STAT5.¹²⁴
- Une diminution de l'activité de STAT1 dans les progéniteurs CD34+ de patients TE avec mutation hétérozygote JAK2 V617F induit, en culture *ex vivo*, des colonies érythroïdes : une hyperactivité de STAT1 favoriserait donc la balance vers le lignage mégacaryocytaire tandis qu'une diminution de cette activité favoriserait un phénotype PV.¹²⁵

- Les mutations de l'exon 12 de JAK2 ne sont retrouvées qu'en cas de PV (et exceptionnellement en cas de TE) car elles induisent une activation intense de P-STAT5 et P-Erk (supérieure à celle induite par JAK2 V617F).¹²⁶
- Dans les modèles murins, la perte de Stat3 associée à Jak2 V617F favorise le lignage mégacaryocytaire, l'apparition d'une fibrose médullaire et une diminution de la survie des souris.¹²⁷ L'activation de Stat3 favoriserait l'émergence d'un phénotype PV et inhiberait le développement d'une thrombocytose.
- Dans les modèles murins, la perte de Stat5 associée à Jak2 V617F induit la régression complète du phénotype de type PV, confirmant le rôle crucial de Stat5 dans l'érythropoïèse.^{128,129} Dans l'une de ces études cependant, la perte de Stat5 associée à JAK2 V617F n'empêche pas le développement d'une myélofibrose (l'impact d'une perte d'expression de Stat5 sur la signalisation Mpl n'est pas étudié).
- Dans les modèles murins, la perte d'expression de Stat1 associée à Jak2 V617F provoque une augmentation de la polyglobulie et une diminution de la thrombocytose suggérant que l'activation de Stat1, associée à Jak2 V617F, favorise l'émergence d'un phénotype TE.¹³⁰

D'autres éléments telles des caractéristiques liées à l'hôte (polymorphisme nucléotidique sur des gènes d'intérêt tels *MPL*, *EPOR*, *JAK2* ou haplotypes incluant ces gènes) ou la présence d'autres mutations antérieures et/ou associées (dites mutations « non driver ») permettent d'expliquer les différences phénotypiques observées avec une même mutation JAK2.

2.2.2.2. Mutations de MPL

Décrites en 2005, les mutations de MPL sont situées dans l'exon 10 du gène et les plus fréquentes concernent la tryptophane W515 située entre le domaine transmembranaire et le domaine cytoplasmique de MPL. Cette mutation, majoritairement hétérozygote, est retrouvée dans 3% des TE et 5% des MF. La tryptophane W515 est située dans le domaine amphipathique du récepteur MPL permettant l'activation spontanée de MPL.¹³¹ Cette mutation (et les changements de conformation induits) permet la dimérisation et l'activation spontanée de MPL en l'absence de TPO, la fixation de la protéine JAK2 et l'activation des voies de signalisation en aval.¹²²

2.2.2.3. Mutation de CALR

En 2013, des mutations, majoritairement hétérozygotes, du gène *CALR* ont été découvertes dans une majorité des TE et MF sans mutation *JAK2* ni *MPL*.¹³² On décrit des mutations de type 1, principalement une délétion de 52 paires de base, qui sont détectées dans les TE et les MF alors que les mutations de type 2, principalement une insertion de 5 paires de base, ne sont observées que dans les TE.¹³³

Le gène *CALR* code une protéine chaperonne du réticulum endoplasmique qui joue un rôle dans le contrôle qualité des protéines N-glycosylées et le stockage du calcium. A l'état normal, CALR se lie aux résidus N-glycosylés du domaine extracellulaire de MPL pour permettre son transport du réticulum endoplasmique vers la surface de la cellule. Les mutations de l'exon 9 de *CALR* modifient la partie C-terminale de la protéine qui permet sa rétention dans le réticulum endoplasmique. De ce fait, la protéine mutante CALR reste liée à MPL lorsque le récepteur migre du réticulum vers la membrane plasmique et induit son activation spontanée en stabilisant sa dimérisation.¹³⁴⁻¹³⁶ MPL est le principal

récepteur impliqué dans ce mécanisme oncogénique induit par la protéine CALR mutée (CSF3R le serait aussi mais dans une moindre mesure), expliquant le phénotype mégacaryocytaire.

2.2.2.4. *Autres mutations affectant la voie de signalisation JAK2-STAT*

D'autres mutations plus rares ont été décrites dans les NMP telles :

- Mutations de l'exon 12 de *JAK2* : retrouvée uniquement en cas de PV ou de MF post-PV, toutes situées entre le domaine pseudo-kinase et les domaines SH2.¹²⁶
- Mutations somatiques de *LNK*

En résumé, les NMP classiques en dehors de la LMC sont des maladies clonales acquises dont la cellule d'origine est une CSH dans laquelle apparaît un évènement génétique somatique (mutation de *JAK2*, *MPL*, *CALR* principalement) qui active la voie de signalisation intracellulaire JAK/STAT, ce qui confère aux progéniteurs myéloïdes une sensibilité accrue à certaines cytokines et un avantage compétitif sur les cellules non mutées au cours de la différenciation myéloïde.

2.2.3. Rôle des mutations « non-driver » dans les NMP

2.2.3.1. Mutations « non-driver » : incidences, impacts et corrélations

Les 3 principales mutations dites « driver » du phénotype NMP, en particulier *JAK2* V617F, n'expliquent pas l'hétérogénéité phénotypique observée chez les patients. Des facteurs génétiques, constitutionnels (SNP) ou acquis, contribuent à cette hétérogénéité.

Les techniques de séquençage ciblés à haut débit ou de séquençage d'exome ont permis d'identifier, chez plus de la moitié des patients, d'autres mutations somatiques, également identifiées dans d'autres hémopathies myéloïdes (SMD, LAM). Ces mutations ne générant pas un phénotype de type NMP chez la souris sont considérées comme « non driver » dans ces maladies.¹³⁷

Ces mutations touchent des gènes impliqués dans la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*), dans la modification des histones (membres du complexe répresseur polycomb de type 2 tels *ASXL1* ou *EZH2*), dans l'épissage des ARN (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*), dans la signalisation intracellulaire (*NF1*, *NRAS*, *KRAS*, *CBL*, *FLT3*, *PPM1D*) et des facteurs de transcription (*TP53*, *RUNX1*, *CUX1*, *ETV6*). Elles sont majoritairement retrouvées dans le clone portant la mutation « driver », plus rarement dans un clone distinct.

Le nombre de ces mutations est corrélé à l'âge : plus le patient est âgé, plus le nombre de mutations somatiques est important.¹³⁷ Le nombre de ces mutations est également corrélé à la pathologie et beaucoup plus important en cas de MF. Dans une étude explorant 28 gènes chez 100 patients, la mutation « driver » est la seule mutation détectée chez 60% des TE (24/40), 43% des PV (13/30) et 23% des PMF (7/30).¹³⁸ Une analyse par séquençage d'exome identifie en moyenne 13 mutations dans les MF (3 mutations somatiques sur des gènes mutés de façon récurrente) et 6 mutations dans les PV/TE (1 seule mutation somatique sur des gènes mutés de façon récurrente, généralement sur *JAK2/MPL/CALR*).¹³²

La nature des mutations est corrélée à la pathologie : les mutations des gènes impliqués dans la modification des histones (*ASXL1*, *EZH2*) sont fréquemment observées en cas de MF alors qu'elles sont plus rares en cas de PV ou de TE. Les mutations des gènes de l'épissage sont fréquentes dans les MF, rares dans les TE, exceptionnelles dans les PV.

Des associations préférentielles entre mutations « driver » et « non driver » ont été mises en évidence. Les mutations des gènes régulateurs de la méthylation de l'ADN (*TET2*, *DNMT3A*) ne présentent pas d'association préférentielle avec une des 3 mutations « driver ». A l'inverse, les mutations des gènes de l'épissage sont rarement associées à la mutation *CALR*.^{139,140}

L'ordre d'acquisition de la mutation « driver » *JAK2* V617F et des mutations « non driver » *DNMT3A* ou *TET2* joue un rôle dans l'expression phénotypique du NMP. *JAK2* V617F est souvent un second évènement mutationnel dans les TE alors qu'elle est le plus souvent l'évènement initial dans les PV et les MF.¹⁴¹

2.2.3.2. Mutations de gènes régulateurs de la méthylation de l'ADN

Les protéines *TET2* et *DNMT3A* jouent un rôle central dans la méthylation des îlots CpG de l'ADN.

TET2 est une enzyme impliquée dans la déméthylation des 5-méthylcytosines en 5-hydroxyméthylcytosines. Les mutations de *TET2* sont détectées dans 10 à 20% des NMP (ce qui en fait la mutation « non driver » la plus fréquente en cas de NMP) et induisent une perte de fonction de la protéine *TET2*.¹⁴² L'ordre d'apparition des mutations *TET2* et *JAK2* contribue au phénotype. Le plus souvent, la mutation de *TET2* précède celle de *JAK2*, le compartiment des CSH est constitué majoritairement de cellules ne présentant que la mutation *TET2* et le phénotype est celui d'une TE ou d'une PV. Plus rarement, la mutation de *TET2* survient après la mutation *JAK2*, le pool de CSH est dominé par des clones double-mutants, les patients présentent le plus souvent une PV et le risque de transformation en LAM est plus élevé.^{141,143} Chez la souris, la coopération entre une perte de fonction de *Tet2* et *Jak2* V617F aggrave le phénotype NMP avec un avantage compétitif plus marqué des CSH double mutantes et maintien du potentiel de renouvellement du phénotype NMP en transplantation sériée.^{144,145}

La protéine *DNMT3A* est impliquée dans la méthylation des cytosines de l'ADN. Les mutations de *DNMT3A* sont détectées dans 5-10% des NMP. Comme pour les mutations de *TET2*, l'ordre d'apparition des mutations *DNMT3A* et *JAK2* semble jouer un rôle important.¹⁴⁶ La mutation *DNMT3A* peut apparaître dans un clone distinct de celui portant la mutation *JAK2*, précéder l'acquisition de la mutation *JAK2* (générant le plus souvent une TE) ou apparaître après la mutation *JAK2* (générant le plus souvent une PV ou un MF). La délétion de *Dnmt3a* dans les LSK de souris *Jak2* V617F accélère le développement de la fibrose médullaire et l'autorenouvellement des CSH.¹⁴⁷

En résumé, si les mutations de *TET2* ou *DNMT3A* précèdent l'apparition de la mutation driver, le clone double-mutant ne présente pas d'avantage compétitif significatif par rapport au clone simple mutant et le phénotype est le plus souvent une TE avec une charge allélique *JAK2* V617F faible. Si les mutations *TET2* ou *DNMT3A* surviennent dans un clone préalablement *JAK2* muté, elles confèrent un avantage compétitif fort à ces cellules et induisent une PV ou une MF du fait d'une charge allélique importante.

Les gènes *IDH1* et *IDH2* codent des enzymes qui convertissent l'isocitrate en α -kétoglutarate. En cas de mutation, l'enzyme mutante induit la production en excès d'un métabolite appelé 2-hydroxyglutarate à partir de l' α -kétoglutarate. Ce métabolite inhibe certaines dioxygénases et des DNA-déméthylases dépendantes de l' α -kétoglutarate (dont *TET2*). Cette activité induit une

hyperméthylation de l'ADN et un blocage de la différenciation. Ces mutations sont détectées dans moins de 5% des NMP, plus souvent en cas de MF, et semblent le plus fréquemment acquises après les mutations « driver ». Elles sont associées à un risque élevé de transformation en LAM. Les croisements des souris KI *Jak2* V617F et KI *IDH1* R132H ou *Idh2* R140Q ont montré une association létale par transformation en LAM avec défaut de mégacaryopoïèse, expansion du pool des CSH et augmentation de leurs capacités d'autorenouvellement.¹⁴⁸

2.2.3.3. Mutations de gènes impliqués dans la modification des histones

Le gène *EZH2* code une histone méthyltransférase appartenant au complexe PRC2 ciblant la lysine 27 de l'histone H3. Les mutations du gène *EZH2*, détectées dans 5% des NMP (plus particulièrement les MF), induisent probablement des pertes de fonction comme en atteste l'abolition de la marque H3k27me3.¹⁴⁹ Les mutations d'*EZH2* confèrent un mauvais pronostic en cas de MF.¹⁵⁰ Trois études modélisent la coopération *Jak2* V617F / perte de fonction d'*Ezh2*.¹⁵¹⁻¹⁵³ La perte d'*Ezh2* favorise l'hyperplasie mégacaryocytaire au détriment de l'érythropoïèse, accélère la progression vers la MF et augmente la capacité de repopulation des CSH des souris *Jak2* V617F, ce qui est associé à une surexpression de gènes cibles du complexe PRC2 (*Lin28b*, *Let7* et *Hmga2*). Une surexpression de *HMGA2* était observée chez les patients atteints de MF. Ces données sont en faveur d'une coopération importante entre *JAK2* V617F et les mutations d'*EZH2*.

Le gène *ASXL1* code une protéine également impliquée dans le remodelage de la chromatine. Les mutations d'*ASXL1* sont plus fréquentes que les mutations d'*EZH2* puisqu'elles touchent environ 30% des patients atteints de MF, plus souvent les MF primitives que les MF secondaires.^{154,155} Contrairement à celles d'*EZH2*, ces mutations sont plus souvent présentes avant l'acquisition d'une mutation « driver » mais elles peuvent apparaître au cours de l'évolution. Elles sont fréquemment associées à des mutations des gènes de l'épissage *U2AF1* et *SRSF2* et sont un facteur de mauvais pronostic indépendant.¹³² Une étude de l'interaction entre une perte de fonction d'*Asx1* et *JAK2* V617F montre une accélération de la myélofibrose avec parfois évolution en LAM, suggérant une coopération directe entre les deux mutations.¹⁵⁶

En résumé, une première série de mutations « non driver » détectées dans les NMP non-LMC affecte la régulation épigénétique de l'ADN, incluant sa méthylation (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) et les modifications des histones (*EZH2*, *ASXL1*). Certaines d'entre elles peuvent apparaître avant l'acquisition d'une mutation « driver », cet ordre d'apparition affectant le phénotype de la maladie. Leur association à une mutation « driver » aggrave le plus souvent le phénotype.

2.2.3.4. Mutations des gènes de l'épissage

2.2.3.4.1. Généralités sur les mutations des gènes de l'épissage

L'épissage alternatif des pré-ARNm est le processus par lequel les introns (et certains exons alternatifs) sont excisés (ou retenus) pour aboutir à un ARNm mature. Ce processus implique la fixation d'un complexe d'ARN et de protéines (« spliceosome ») sur de courtes séquences nucléotidiques spécifiques présentes sur le pré-ARNm. Pour guider ce complexe, les exons possèdent des séquences consensus en 5' (séquence donneuse GU) et en 3' (séquence acceptrice AG) qui sont reconnues par des complexes de petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNP), appelés U1 et U2.

On décrit 5 modèles d'épissage alternatif en fonction de la caractéristique des introns/exons présents sur un pré-ARNm :

- Saut d'exon (« exon skipping » ; ES) : processus le plus fréquent, un exon, dit « cassette exon », situé entre deux autres exons est excisé, générant une isoforme dont la stabilité peut être distincte de celle des isoformes usuelles du gène.
- Exons mutuellement exclusifs (« mutually exclusive exons » ; MEE) : un des deux exons est retenu, les 2 exons concernés ne pouvant être retenus en même temps.
- Site d'épissage alternatif de l'extrémité 5' du pré-ARNm (« alternative 5' splice site » ; A5SS) : l'extrémité 5' d'un exon est retenue ou épissée.
- Site d'épissage alternatif de l'extrémité 3' du pré-ARNm (« alternative 3' splice site » ; A3SS) : l'extrémité 3' d'un exon est retenue ou épissée. Ce type d'épissage peut décaler le cadre de lecture et générer un codon stop ou favoriser la dégradation secondaire de l'ARNm (« nonsense-mediated decay » ; NMD)
- Rétention d'intron, qui peut aboutir à une diminution de la stabilité de l'ARNm (par augmentation majeure de la taille de l'ARNm notamment) et à sa dégradation par la voie NMD.

Ce processus, impliqué dans l'expression de plus de 90% des gènes, génère à l'état normal, à partir d'un seul et même gène, de multiples isoformes d'ARNm, aboutissant à une grande diversité protéique.

En 2011, des mutations récurrentes de gènes impliqués dans l'épissage des pré-ARN messagers ont été découvertes dans les hémopathies myéloïdes et d'autres cancers.¹⁵⁷ Quatre gènes sont fréquemment mutés (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1* et *ZRSR2*) mais d'autres mutations appartenant au spliceosome ont été décrites (*PRPF8*, *LUC7L2*). Ces mutations sont présentes chez plus de la moitié des patients atteints de SMD où elles peuvent être fondatrices de la pathologie. Des corrélations phénotypiques ont été mises en évidence entre la mutation *SF3B1* et la présence de sidéroblastes en couronne (de bon pronostic) ou la mutation *SRSF2* et le développement d'une LMMC lorsque cette mutation apparaît dans le contexte d'une mutation de *TET2*. Les mutations des gènes de l'épissage ont la particularité d'être quasi-exclusivement hétérozygotes et mutuellement exclusives. Elles induisent le plus souvent une modification (ou un gain) de leur fonction mais les mutations de *ZRSR2* induisent quant à elles une perte de fonction.¹⁵⁸

Le processus d'épissage est profondément bouleversé en cas de mutation d'un de ces gènes. Les mutations *SRSF2* et *U2AF1* modifient principalement l'épissage par saut d'exon et les mutations de *SF3B1* par rétention d'intron et utilisation de sites alternatifs de l'extrémité 3' du pré-ARNm.^{159,160} Plusieurs voies biologiques sont altérées par ces mutations : épissage des ARN, synthèse des protéines, fonctions mitochondriales, signalisation des sirtuines (enzymes avec activité histone déacetylase) et signalisation NF-κB. Des gènes cibles privilégiés ont été identifiés : *ABCB7*, *SEPT2*, *ERFE* en cas de mutation de *SF3B1*, expliquant le phénotype sidéroblastique; *CSF3R*, *AKAP8*, *EZH2* en cas de mutation de *SRSF2*, contribuant au phénotype hypoprolifératif par une diminution de la réponse des progéniteurs myéloïdes au G-CSF; *STRAP*, *H2AY* et *EZH2* en cas de mutation d'*U2AF1*.¹⁵⁹⁻¹⁶²

Une hyperactivation de la signalisation NF-κB est observée en cas de mutations de *SF3B1*, *SRSF2* ou *U2AF1*. Cette hyperactivation est attribuée à l'épissage aberrant du gène codant la sérine/thréonine IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase 4) en cas de mutation d'*U2AF1*, à l'usage aberrant d'un site d'épissage alternatif de l'extrémité 3' du pré-ARNm de *MAP3K7*, induisant sa dégradation par la voie NMD, lorsque *SF3B1* est muté, et à un épissage alternatif par saut d'exon de *CASP8* (un gène activateur

de la voie NF- κ B) à l'origine de la génération d'une isoforme protéique tronquée en cas de mutation de *SRSF2*.^{163,164}

Enfin, les mutations de *SRSF2* et d'*U2AF1* partagent une autre caractéristique commune puisqu'elles sont impliquées dans la génération de R-loops. Les R-loops apparaissent pendant la transcription et correspondent à une structure hybride, normalement transitoire, d'ARN simple brin fixée sur l'un des brins d'ADN tandis que l'autre brin d'ADN reste libre (et forme une boucle). L'excès de formation de R-loops induit une instabilité génomique avec augmentation des dommages à l'ADN, stress réplicatif et activation de la voie de réparation ATR-Chk1.¹⁶⁵ Ces données, confirmées chez l'homme et la souris, suggèrent que les mutations des gènes de l'épissage favorisent l'apparition d'autres mutations.¹⁶⁶

2.2.3.4.2. Modélisation des mutations des gènes de l'épissage chez la souris

Les mutations des gènes de l'épissage identifiées dans les hémopathies myéloïdes ont été introduites dans les CSH chez la souris pour en étudier les conséquences biologiques dans le système hématopoïétique. Les conséquences de ces mutations sont distinctes des effets de la perte d'expression (complète ou incomplète) des gènes correspondants.

La modélisation des mutations de SF3B1

Les souris *Sf3b1* haplo-insuffisantes (*i.e.* KO hétérozygote) présentent une discrète anémie macrocytaire avec de rares sidérobastes en couronne, une discrète augmentation du chiffre des plaquettes circulantes, et une splénomégalie par hématopoïèse extra-médullaire. Ce modèle ne récapitule que très partiellement le phénotype des SMD avec mutation de *SF3B1* (en particulier la mutation K700E).¹⁶⁷ Les modèles KI avec mutation *Sf3b1* K700E hétérozygotes, plus physiologiques, ont une discrète anémie macrocytaire en lien avec des défauts de maturation érythroïde, sans formation de sidérobastes en couronne (caractéristique usuelle des SMD avec mutation *SF3B1*). Dans des expériences de reconstitution compétitive de l'hématopoïèse, les CSH *Sf3b1* K700E hétérozygotes ont un désavantage compétitif vis-à-vis des CSH sauvages.^{168,169} Pourtant, dans des expériences de xénotransplantation, les CSH humaines de patients SMD avec mutation *SF3B1* persistent dans le temps.¹⁷⁰ La mutation *Sf3b1* K700E provoque l'utilisation préférentielle d'un site d'épissage cryptique de l'extrémité 3' de certains pré-ARNm au sein des cellules de la moelle totale, des Lin- et des progéniteurs Lin- Kit+, comme cela est observé dans la pathologie humaine, mais les gènes différemment épissés sont distincts.

La modélisation des mutations d'U2AF1

Les premières études de modélisation des mutations d'*U2AF1* ont été réalisées par des méthodes de transduction, avant le recours à la transgénèse révélant que l'expression de la mutation *U2AF1* S34F dans des CSH murines altère l'hématopoïèse et provoque une leucopénie (diminution des lymphocytes B et des monocytes), sans anomalie des lignées érythroïde et plaquettaire, ni transformation en SMD ou LAM après un an de suivi.^{157,171} Dans ce modèle, il existe une augmentation des LSK (en lien avec une augmentation des MPP) associée à une diminution de la capacité à reconstituer l'hématopoïèse en compétition face à des CSH sauvages. La mutation modifie l'épissage de certains pré-ARNm (les plus

fréquemment atteints sont impliqués dans l'épissage et la traduction protéique) au sein des CMP par l'utilisation trop fréquente d'un site d'épissage cryptique de leur extrémité 3', comme chez l'homme.

Les souris KI *U2af1* S34F sous le contrôle du promoteur Mx1 développent, après injection de plpC, une anémie et une leucopénie (essentiellement une lymphopénie B) sans se transformer spontanément en LAM.¹⁷² Il existe une diminution des LSK et des SLAM dont la compétitivité face à des CSH sauvages est réduite. Les modifications de l'épissage (étudiées dans les cellules de moelle totale et les progéniteurs myéloïdes Lin- Kit+) sont similaires à celles observées chez l'homme. Les souris KI *U2af1* S34F sous le contrôle du promoteur *Vav* présentent un phénotype similaire avec anémie macrocytaire et leucopénie, diminution des LSK, CMP et MEP, et défaut de reconstitution et de compétitivité.¹⁷³ Il existe une augmentation de l'expression de gènes de la réparation de l'ADN et du cycle cellulaire au sein des LSK et des CMP, comme dans le modèle murin KI *Srsf2* P95H.

La modélisation des mutations de SRSF2 – l'expérience américaine

L'équipe d'Omar Abdel-Wahab a généré les premières souris KI *Srsf2*^{P95H} en plaçant le gène muté sous le contrôle du promoteur Mx1. La moelle de ces souris a été transplantée chez des souris sauvages secondairement traitées par plpC et le phénotype des souris *Srsf2*^{P95H} hétérozygotes a été comparé à celui des souris *Srsf2*^{-/-}.¹⁷⁴ Les souris KO et KI présentent une leucopénie (lymphopénie B). Les souris *Srsf2*^{P95H} hétérozygotes développent une discrète anémie macrocytaire et des signes de dysplasie avec cellularité médullaire normale. Les souris *Srsf2*^{-/-} présentent une anémie mais les globules rouges gardent une taille normale, sans dysplasie, tandis que la cellularité médullaire diminue. Chez les souris *Srsf2*^{P95H} hétérozygotes, il existe une augmentation du nombre de cellules LSK/CD48+/CD150+ (et non des SLAM CD48-/CD150+) dont la prolifération et l'apoptose sont plus marquées. Chez les souris *Srsf2*^{-/-}, la compétitivité et les capacités d'autorenouvellement des CSH sont très sévèrement altérées alors qu'elles ne sont que réduites chez les souris *Srsf2*^{P95H} hétérozygotes. Ces données indiquent une altération de la fonction de la protéine SRSF2 par la mutation P95H plutôt qu'une haplo-insuffisance ou un effet dominant négatif de la forme mutée.

L'équipe d'Omar Abdel-Wahab a montré que la mutation *Srsf2*^{P95H} induit des altérations de l'épissage des pré-ARNm. A l'état normal, SRSF2 se lie à des motifs 5'-SSNG-3' (S=C ou G ; N=A, U, C ou G) du pré-ARNm. La mutation *Srsf2*^{P95H} induit des modifications des mécanismes d'épissage, les modifications les plus importantes affectant les sauts d'exons. Elle favorise la reconnaissance de motifs consensus présents sur les sites initiateurs de l'épissage d'un exon : tandis que la forme sauvage se fixe à part équivalente sur les motifs CCNG et GGNG au niveau des sites initiateurs de l'épissage d'un exon dans le pré-ARNm, la forme mutée P95H reconnaît préférentiellement le motif CCNG. En revanche, elle reconnaît mal le motif GGNG. Il existe donc un excès de saut d'exons au niveau des sites CCNG et un défaut des sauts d'exons à partir des motifs GGNG. Par exemple, la mutation P95H induit l'inclusion d'un exon « toxique » dans le pré-ARNm du gène *Ezh2*. Cet exon contient un codon stop prématuré responsable de la synthèse d'un ARNm dégradé par la voie NMD. Il en résulte une perte de fonction d'*Ezh2*. Ces résultats permettent de comprendre l'observation chez l'homme du caractère mutuellement exclusif des mutations *SRSF2*^{P95H} et *EZH2* dans les hémopathies myéloïdes. *Bcor* est un autre gène dont l'épissage est altéré par la mutation P95H de la protéine *Srsf2*.

La modélisation des mutations de SRSF2 – l'expérience japonaise

L'équipe de Seichi Ogawa a généré un modèle murin KI *Srsf2*^{P95H} sous le contrôle du promoteur *Vav1*, la mutation étant exprimée dès la naissance dans le tissu hématopoïétique.¹⁷⁵ Cette construction s'affranchit des effets pro-prolifératifs induits par l'injection de plpC dans un modèle *Mx1-Cre*, permettant d'étudier les souris natives et les effets de la transplantation.

Après 90 semaines, les souris mutées constitutivement ne présentent pas de transformation en LAM ou de diminution de la survie, pas de modification significative des paramètres sanguins (hormis une discrète diminution du taux d'hémoglobine avec macrocytose) ni de la cellularité médullaire. Il existe une diminution significative du nombre de LSK en lien avec une diminution des CSH (SLAM) et des MPP, et une diminution significative (mais relativement modérée) de la proportion de CSH en quiescence (sans excès d'apoptose). Il n'y a pas d'autre altération des progéniteurs érythroïdes (EP) mais il existe, là encore, des anomalies de la différenciation lymphoïde B.

Après transplantation (qui permet d'augmenter le stress réplicatif induit par la mutation), il existe une diminution significative du nombre de CSH (augmentation du cycle cellulaire et de l'apoptose) et des progéniteurs, avec un discret biais myéloïde, une leucopénie avec des troubles de différenciation lymphoïde B, une dysplasie érythrocytaire avec diminution du taux d'hémoglobine et macrocytose, et une diminution de la survie à long terme (sans transformation en LAM). On note la présence de mégacaryocytes dans la rate et une augmentation du nombre de mégacaryocyte dans la moelle osseuse paratrabéculaire (sans augmentation significative du nombre de plaquettes). Il existe un désavantage compétitif des CSH *Srsf2*^{P95H} face à des CSH sauvages, en particulier en transplantation sériée, sans altération des capacités de « homing » des cellules.

La mutation *Srsf2*^{P95H} favorise l'exclusion de cassettes exons dans les LSK et les progéniteurs LK (Lin-/Sca-/Kit+) de la moelle osseuse en reconnaissant préférentiellement le motif CCNG au motif GGNG. Les gènes affectés sont notamment *Csf3r*, *Stag2*, *Fyn*, *Gnas*, *Setd2* et *Nsd1*, mais pas *Ezh2*. Le gène *Gata1* est surexprimé tandis que les gènes *Mpl*, *Irf4*, *Csf3r* et *Trp53bp1* sont sous-exprimés. Les voies biologiques les plus altérées sont l'identité souche, le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la différenciation et le métabolisme des ARN.

La modélisation des mutations de SRSF2 – L'expérience australienne

L'équipe australienne de Carl Walkley a introduit la mutation *Srsf2*^{P95H} dans le locus endogène de l'exon 1 du gène *Srsf2*.¹⁷⁶ Le croisement avec des souris Rosa26-CreERT2, LysM-Cre et Scl-CreERT a permis de remplacer le gène sauvage par la forme mutée dans toutes les cellules sous l'effet du tamoxifène, dans les progéniteurs myéloïdes uniquement et dans les CSH, respectivement.

Les souris Rosa26-CreERT2/*Srsf2*^{P95H} à l'état natif (i.e. sans transplantation) développent une macrocytose sans anémie puis une hyperleucocytose au bénéfice des populations myéloïdes et lymphoïde T. Dans la moelle osseuse, il existe une augmentation du pourcentage de cellules myéloïdes, des troubles de la lymphopoïèse B, et une réduction du nombre de progéniteurs érythroïdes sans altération du nombre de CSH. Le phénotype observé sur les souris Scl-CreERT/*Srsf2*^{P95H} est relativement similaire. En revanche, celui des souris LysM-Cre/*Srsf2*^{P95H} est normal, suggérant la nécessité d'exprimer *Srsf2*^{P95H} dans les CSH (et non dans les progéniteurs myéloïdes) pour générer un phénotype hématologique.

Les techniques de transplantation compétitive d'une moelle *Srsf2*^{P95H} face à une moelle sauvage confirment une nouvelle fois le désavantage compétitif conféré par la mutation. Toutefois, et c'est probablement le résultat le plus important de cette étude, un avantage compétitif de la forme *Srsf2*^{P95H} apparaît au cours du vieillissement (compétition face à une moelle sauvage de même âge). En outre, la transplantation de la moelle des souris Rosa26-CreERT2/*Srsf2*^{P95H} et Scl-CreERT/*Srsf2*^{P95H} génère un biais de production des cellules myéloïdes (neutrophiles immatures et monocytes). Enfin, ces modèles développent en vieillissant un phénotype léthal de SMD/SMP avec anémie, accumulation de polynucléaires neutrophiles et de monocytes (Cd11b+/Ly6C+) dysplasiques et thrombocytose avec macroplaquettes. Ce phénotype est corrélé à l'apparition de mutations de gènes d'intérêt dans les hémopathies myéloïdes, en l'occurrence *Dnmt3a*, *Phf6*, *Tet2*, *Npm1*, *N/K-Ras* ou *Nf1*. Dans les cellules Lin- Kit+, on observe une diminution de l'expression de *Socs3* associée à une augmentation de l'expression d'*Hmga2* avec activation de la voie p38-MAPK. Les altérations de l'épissage identifiées affectent les gènes *Csf3r* et *Fyn*, mais ni *Ezh2*, ni *Bcor*.

La modélisation des mutations de SRSF2 – Une synthèse

Ces différents modèles murins nous indiquent que la mutation *Srsf2*^{P95H} génère un phénotype hématologique discret, les CSH mutées démontrant un défaut de compétitivité face à des CSH sauvages, mais il est probable que ce phénotype se renforce au cours du vieillissement.¹⁷⁷ La coopération avec d'autres mutations semble nécessaire pour générer un phénotype plus sévère.¹⁷⁸

2.2.3.4.3. Mutations des gènes de l'épissage dans les NMP : incidence et corrélations

Les travaux entrepris à partir de 2011 ont permis de décrire l'incidence des mutations des gènes d'épissage chez les patients atteints de NMP.

Des mutations de *SF3B1*, *U2AF1* ou *SRSF2* peuvent apparaître dans les NMP *JAK2* V617F ou *MPL* muté mais sont exceptionnellement associées à une mutation *CALR*.^{139,140} Cette observation reste inexpliquée mais suggère que l'apparition d'une mutation d'un gène de l'épissage dans un contexte *CALR* muté diminue la compétitivité des cellules, voire provoque la mort cellulaire. Les mutations *SRSF2*^{P95} sont fréquemment associées aux mutations d'*ASXL1*, de *TET2* et d'*IDH1/2* et les mutations d'*U2AF1* sont fréquemment associées aux mutations d'*ASXL1*.¹³² Dans la majorité des cas, les mutations des gènes de l'épissage apparaissent après les mutations « driver ».

Les mutations des gènes de l'épissage sont détectées dans moins de 2% des TE ou des PV et sont associées à une augmentation du risque de décès (*SRSF2*) ou d'évolution myélofibrosante (*U2AF1*).¹⁷⁹ L'incidence des mutations de *SF3B1*, *SRSF2* ou *U2AF1* est plus importante en cas de MF (primitive ou secondaire à une TE/PV) puisque ces mutations sont détectées dans 8%, 12% et 14% des cas, respectivement.^{137,180} Ces mutations seraient plus fréquentes dans les MFP que dans les MF secondaires (*SRSF2*^{P95} dans 22% des MFP et 3% des MF secondaires).¹⁸¹ Les mutations *SRSF2*^{P95} détectées dans les situations dites « pré-fibrotiques » seraient associées à une évolution systématique vers une MF.¹⁸² Des corrélations clinico-biologiques ont été établies avec les mutations *SF3B1* (âge avancé, présence de sidéroblastes en couronnes), *SRSF2*^{P95} (âge avancé, anémie) et *U2AF1* (anémie et thrombopénie).¹³⁷ Une mutation *SRSF2*^{P95} est généralement associée à un chiffre des plaquettes sanguines normal, voire augmenté.¹³⁷

La détection de la mutation *SRSF2*^{P95} dans une MF primitive ou secondaire est associée à une survie diminuée et à un risque accru de transformation en LAM, ce qui n'est pas le cas des mutations *U2AF1* et *SF3B1*.^{183,184} Une étude récente suggère de différencier la mutation *U2AF1*^{Q157}, de mauvais pronostic, de la mutation *U2AF1*^{S34}, sans impact sur le pronostic.¹⁸⁵

Des mutations des gènes de l'épissage sont fréquemment détectées lors de la transformation d'un NMP en LAM. Les mutations *SRSF2*^{P95} sont les plus fréquentes (18% des cas) et confèrent un pronostic redoutable.¹⁸⁶ Les mutations d'*U2AF1* et de *SF3B1* sont retrouvées dans 9% et 8% des cas, respectivement.¹⁸⁰

En résumé, une seconde série de mutations somatiques associées aux mutations « driver » dans les NMP classiques non-LMC affecte des gènes de l'épissage, ce qui altère l'épissage des pré-ARNm, génère des R-loops et active la voie NF-κB. Ces mutations génèrent chez la souris un phénotype hématologique discret lorsqu'elles sont isolées, suggérant la nécessité d'une coopération avec d'autres mutations pour induire un phénotype franc. Elles apparaissent le plus souvent après les principales mutations « driver » dans les NMPs, leur apparition étant associée à un phénotype plus grave (fibrose, leucémie aiguë) et à une diminution de la survie des patients.

L'interaction entre une mutation « driver » de NMP et la mutation d'un gène de l'épissage n'a, à l'heure actuelle, jamais été modélisée chez la souris.

2.3. Risques évolutifs des NMP

2.3.1. Evolution d'une TE/PV en myélofibrose

2.3.1.1. Risque d'évolution d'une TE/PV en myélofibrose

L'évolution d'une TE/PV en MF est un évènement lourd de conséquence car il altère la qualité et l'espérance de vie des patients.

Le risque d'évolution d'une TE en MF est estimé à 0.7% à 10 ans et 2.1% à 15 ans avec un délai médian entre 7 et 16 ans à partir du diagnostic.¹⁸⁷ Ce risque a été revu à la baisse après avoir défini une distinction entre TE et MF pré-fibrotique car le risque était évalué entre 0.8 et 4.9% à 10 ans, entre 4 et 11% à 15ans avant cette distinction.¹⁸⁸ Les paramètres clinico-biologiques associés à un risque d'évolution d'une TE en MF (établis avant la distinction TE – MF préfibrotique) sont l'âge avancé, une hyperleucocytose, une anémie et une fibrose réticulinique. La mutation *JAK2*^{V617F} n'est pas directement associée à un risque accru de transformation d'une TE en MF par rapport aux mutations *CALR* et *MPL*, mais la charge allélique de *JAK2*^{V617F} est associée au risque évolutif, de même que la détection de mutations associées à ces mutations « driver », en particulier celles d'*ASXL1*.^{187,189}

Le risque d'évolution d'une PV en MF est plus important puisque l'on estime ce risque entre 4.9 et 6% à 10 ans et entre 6 et 14% à 15 ans.¹⁸⁸ Le risque augmente avec le temps et le délai médian dépend de l'âge (il est de 8 ans chez les sujets de plus de 65 ans et de 20 ans chez ceux de moins de 45 ans).¹⁹⁰ Les facteurs de risque sont similaires à ceux observés dans les TE : âge avancé, hyperleucocytose, fibrose réticulinique et splénomégalie. La charge allélique de *JAK2*^{V617F} est, là encore, corrélée au risque d'évolution fibrosante, les patients présentant une mutation homozygote ayant un risque plus élevé que les patients hétérozygotes.^{191,192}

L'impact des mutations « non driver » sur le développement de la fibrose a été plus récemment décrit mais demeure controversé.

Une étude, réalisée sur une cohorte de 2035 patients, suggère que les mutations des gènes *TET2*, *IDH2*, *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* et *ZRSR2* sont des facteurs contributifs indépendants de l'évolution d'une PV/TE vers une MF.¹³⁷ Une étude réalisée sur 502 patients TE et 404 patients PV conclut que seules les mutations d'*U2AF1* et de *SF3B1* (détectées chez les patients atteints de TE) sont associées à un risque d'évolution en MF secondaire.¹⁷⁹ Une troisième étude, basée sur des biopsies ostéo-médullaires répétées au cours du temps chez des patients PV/TE, montre que les mutations fréquemment identifiées dans les CHIP (*TET2*, *ASXL1* et *DNMT3A*) ne sont pas corrélées à un risque d'évolution en MF, à l'inverse des mutations rarement identifiées dans les CHIP (*SRSF2*, *U2AF1*, *SF3B1*, *IDH1/2*, *EZH2*).¹⁹³ Dans une quatrième étude, une corrélation est observée entre la fréquence des mutations d'*ASXL1* et d'*EZH2* et le grade de fibrose médullaire.¹⁹⁴ Les mutations d'*ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2* et *EZH2* sont aussi plus fréquemment retrouvées dans les formes évoluées de MF comparées aux formes pré-fibrotiques.¹⁹⁵ Toutefois, une étude similaire ne retrouve pas de différence de distribution des mutations « non driver » en fonction du grade de fibrose.¹⁹⁶

En résumé, l'étude des corrélations clinico-biologique ne valide pas clairement le rôle des mutations « non driver » dans le développement de la MF chez les patients atteints de PV ou TE. Ce sont les modèles murins associant des pertes de fonction des gènes *Asx1* ou *Ezh2* à la mutation *JAK2*^{V617F} qui suggèrent un rôle pro-fibrosant de ces mutations le plus souvent secondaires.

2.3.1.2. Mécanismes impliqués dans le développement de la fibrose médullaire

2.3.1.2.1. Généralités sur le processus fibrotique

La fibrose d'un tissu résulte du dépôt anormal de fibres de réticuline et/ou de collagène dans ce tissu. Elle est induite par un processus inflammatoire aigu ou chronique. Elle peut aboutir à la défaillance de l'organe affecté. Ce processus est impliqué dans 50% des décès dans le monde occidental. Elle s'installe schématiquement en 4 phases : initiation (stimulus lésionnel), activation de cellules effectrices (ie productrices de matrice extra-cellulaire), élaboration de la matrice extra-cellulaire et défaut de résorption de cette MEC.¹⁹⁷

- La lésion initiale provoque le recrutement de cellules inflammatoires (lymphocytes, polynucléaires neutrophiles, éosinophiles, basophiles, monocytes/macrophages, mastocytes). La phase initiale du processus fibrotique comporte aussi l'activation du facteur de transcription c-Jun dans les cellules stromales du tissu.¹⁹⁸
- Les cellules inflammatoires recrutées et les cellules stromales secrètent des cytokines qui activent les cellules effectrices de la fibrose.¹⁹⁹ Le TGF- β est la principale cytokine qui régule la différenciation, la prolifération et l'activation des cellules effectrices de la fibrose. D'autres molécules contribuent : PDGF, CTGF, angiotensine II, endotheline-1 notamment.
- La principale cellule effectrice de la fibrose est le myofibroblaste, un fibroblaste exprimant l'actine α du muscle lisse (ACTA2+).²⁰⁰ Les myofibroblastes produisent les protéines de la MEC responsables de la fibrose (collagène et fibronectine). Ils ont aussi une activité contractile responsable de la déformation de l'organe, ce qui amplifie le processus fibrotique.

- Alors que, à l'état normal, la synthèse de collagène est compensée par la dégradation du collagène plus ancien par des métalloprotéases ; le développement de la fibrose se caractérise par un défaut de résorption du collagène synthétisé.

Le myofibroblaste a de multiples origines. Il dérive de la différenciation de cellules mésenchymateuses telles qu'un fibroblaste résidant, un péricyte (cellule péri-endothéliale exprimant le marqueur NG2), ou un fibrocyte (fibroblaste « au repos », exprimant les marqueurs CD34/CD45/collagen I). Ces cellules dérivent elles-mêmes de cellules progénitrices mésenchymateuses (d'origine médullaires ou résidentes dans l'organe). Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont des cellules rares qui s'enroulent autour des vaisseaux (artérioles et sinusoides) au contact des cellules endothéliales. Elles expriment la Nestine (Nes), des marqueurs mésenchymateux comme PDGFR α , CD51, et Sca-1, le récepteur de la leptine (LepR) et le marqueur des péricytes NG2.²⁰¹ Les monocytes ont aussi été impliqués, en particulier dans la génération de fibrocytes. Une possible origine épithéliale, par transition épithélio-mésenchymateuse, a été proposée mais reste controversée.²⁰⁰

L'origine du myofibroblaste dépend de l'organe dans lequel se développe la fibrose. Il s'agit des fibroblastes et des péricytes dans le rein, des cellules stellaires dans le foie, des fibroblastes tissulaires ou circulants et de cellules périvasculaires Gli1⁺ « pericyte-like » dans le cœur, de cellules mésenchymateuses résidentes exprimant le facteur de transcription TBX4 dans le poumon, de fibroblastes dermiques, de péricytes et d'adipocytes dans la peau sclérodermique.²⁰²⁻²⁰⁵

En cas de résolution de la fibrose, le myofibroblaste peut se dédifférencier en fibroblaste, voire se différencier en cellule adipocytaire ou apparentée, dans la peau et les poumons respectivement.^{200,206}

En résumé, les myofibroblastes ont une origine essentiellement mésenchymateuse (*i.e.* non endothéliale, non épithéliale, non hématopoïétique) et locale (*i.e.* présente dans l'organe et non d'origine médullaire) du myofibroblaste.

2.3.1.2.2. Généralités sur la fibrose médullaire

A l'état normal, la moelle osseuse est pauvre en fibres de collagène. La fibrose médullaire se caractérise le dépôt de fibres de réticuline et de collagène, la formation d'os (ostéosclérose) et une angiogénèse accrue. Contrairement à la fibrose réticulinique, la fibrose collagène est un marqueur de sévérité de la MF et elle n'est que peu réversible.²⁰⁷

Il existe un consensus européen des critères d'évaluation histologique de la sévérité de la fibrose médullaire :²⁰⁷

- Grade 0 : Moelle osseuse normale, fibre(s) de réticuline linéaire(s) isolée(s) sans intersection (= tissu médullaire normal)
- Grade 1 : Réseau lâche de réticuline avec nombreuses intersections, en particulier dans les zones périvasculaires.
- Grade 2 : Augmentation diffuse et dense des fibres de réticuline avec nombreuses intersections, occasionnellement des faisceaux de collagène et/ou des foyers d'ostéosclérose.
- Grade 3 : Augmentation diffuse et dense des fibres de réticuline avec nombreuses intersections, présence de gros faisceaux de collagène, souvent associés à une ostéosclérose importante.

L'imagerie numérique permet d'accroître la reproductibilité de cette évaluation.²⁰⁸ Les coupes histologiques colorées de moelle osseuse sont numérisées puis les pourcentages de pixels noirs (correspondant aux fibres de réticuline) sont calculés en utilisant un algorithme de déconvolution de couleur.

Les NMP sont les principales pathologies pourvoyeuses de fibrose médullaire mais d'autres causes sont possibles : autres hémopathies (leucémie aigüe myéloïde ou lymphoblastique, SMD, leucémie à tricholeucocytes), infections (VIH, leishmaniose), médicaments (IL-11, GM-CSF, agoniste de TPO) et pathologies auto-immunes.

2.3.1.2.3. Cellules effectrices de la fibrose médullaire dans les NMP

Dès les années 1980, il avait été établi que les cellules effectrices de la myélofibrose chez les patients NMP ne faisaient pas partie du clone hématopoïétique malin.²⁰⁹⁻²¹¹ L'émergence des myofibroblastes médullaires apparaissait donc comme un processus réactionnel induit par les cellules hématopoïétiques transformées et les cytokines qu'elles sécrètent.

Pourtant, en 2016, la notion de myofibroblaste réactionnel a été remise en cause par la mise en évidence de fibrocytes clonaux issus de la différenciation de monocytes CD14⁺.²¹² Ces fibrocytes, qui expriment des marqueurs de lignage hématopoïétique (CD34, CD43, CD45, CD68, LSP-1) et de stroma (collagène I, collagène III et fibronectine), sont peu abondants dans la moelle osseuse normale mais s'accumulent en cas de MF, chez l'homme comme dans un modèle murin MPL W515L. Cependant, il n'est pas établi que ces cellules soient des cellules effectrices de la fibrose.

En 2017, deux études ont montré que la cellule d'origine du myofibroblaste dans la moelle est plutôt une cellule stromale mésenchymateuse (CSM). La première a montré que les CSM de la moelle osseuse exprimant LepR se différencient en myofibroblaste dans un modèle murin de fibrose médullaire induite par la TPO.²¹³ La seconde a montré dans un autre modèle murin de myélofibrose que les CSM de la moelle osseuse exprimant le facteur de transcription Gli1 (cellules péri-artériolaires Gli1⁺ exprimant partiellement Nes mais pas LepR) sont recrutées des niches endostéales et périvasculaires et sont la principale source de myofibroblaste.²¹⁴ La transplantation de moelle sauvage à des souris Gli1^{-/-} secondairement traitées par TPO, ou la transplantation de moelle JAK2 V617F à des souris Gli1^{-/-}, révèle un défaut de formation de la fibrose. Plus récemment, cette seconde équipe (Rebekka Schneider) a utilisé une approche unicellulaire pour montrer que la proportion des CSM « adipogéniques » (exprimant Lepr, Pdgfra, Vcam1, Cxcl12, Kitl, Angpt1 et Mgp, Adipoq) et des CSM « ostéogéniques » (exprimant Lepr, Spp1, Wif1, Ibsp, Sp7, Bgalp), qui toutes expriment Gli1, augmente au cours du développement de la fibrose avec expression concomitante de gènes de protéines de la MEC et d'une signature ostéogénique. Ces CSM « transformées » en myofibroblastes et cellules effectrices de l'ostéosclérose médullaire perdent leur capacité de soutien du tissu hématopoïétique (diminution de Cxcl12) et présentent une activation des voies de signalisation du TGF- β , du TNF- α et de la signalisation JAK-STAT.²¹⁵

L'hématopoïèse clonale d'un NMP peut modifier donc le phénotype des cellules stromales mais elle a également la capacité d'altérer le micro-environnement. Ainsi, les cellules hématopoïétiques myéloïdes matures du clone de LMC induisent un biais de différenciation des CSM vers le lignage ostéoblastique.²¹⁶ Dans les NMP JAK2 V617F, la population clonale sécrète de l'IL-1 β qui induit la mort des cellules de Schwann des terminaisons nerveuses intra-médullaires.²¹⁷ La neuropathie intra-médullaire engendrée est responsable de l'expansion des CSM Nes⁺ dont le biais de différenciation

ostéoblastique explique l'ostéosclérose. Ces altérations touchant les cellules nerveuses de la niche hématopoïétique ont été confirmées récemment par l'analyse à l'échelle unicellulaire des cellules stromales de la moelle osseuse.²¹⁵ Toutefois, la proportion des progéniteurs des cellules de Schwann, en particulier les cellules myélinisantes Gli1^+ augmente en cas de fibrose.

Si l'hématopoïèse clonale d'un NMP peut modifier le phénotype des cellules stromales et altérer le microenvironnement pour induire la fibrose, l'inverse semble également vrai. Dans le contexte d'une MF, chez l'homme comme chez la souris, les cellules stromales et endothéliales de la moelle osseuse produisent en excès une forme spécifique de fibronectine, dite EDA. Cette fibronectine EDA issue d'un épissage alternatif, favorise le développement de la fibrose médullaire via TLR4 et une mégacaryopoïèse inflammatoire.²¹⁸

2.3.1.2.4. Cytokines inductrices de la fibrose médullaire dans les NMP

Les cytokines pro-inflammatoires libérées par les cellules de la moelle osseuse (IL-1 β , IL-1RA, IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, TNF α , G-CSF, IFN α , MIP-1 α (CCL3), MIP-1 β (CCL4), HGF, IP-10, MIG, MCP-1 (CCL2) et VEGF) contribuent aux signes cliniques des patients atteints de MF. Parmi ces cytokines, le taux d'IL-8, d'IL-2R, d'IL-12 et d'IL-15 est corrélé à la survie des patients (de manière indépendante des facteurs cliniques classiques) tandis que le taux d'IL-8 est corrélé au risque de transformation en LAM.²¹⁹

Une étude plus récente a trouvé des taux plasmatiques élevés de VEGF, d'IL-10, de TNF α , d'IL-16 et d'IL-6.²²⁰ Le marquage intra-cellulaire des cytokines couplé à la cytométrie de masse a permis de déterminer la source de chacune de ces cytokines : toutes les populations de cellules myéloïdes sont impliquées. Les monocytes circulants, en particulier les monocytes classiques CD14 $^+$ CD16 $^-$, présentent un marquage intracellulaire intense (TNF, MIP-1 α , IL-10 et TGF- β latent). Les auteurs concluent que les monocytes sont la principale source de cytokines pro-inflammatoires mais cette étude n'analyse pas la contribution des mégacaryocytes.

Le rôle respectif des cytokines produites en excès dans le contexte d'une MF, non seulement par les cellules myéloïdes clonales mais aussi par les cellules sauvages, n'est pas établi.²²¹ Seules certaines d'entre elles ont été impliquées dans l'induction du processus fibrogénique au niveau médullaire. Il s'agit de

- TGF- β 1 (cf plus bas).²²²⁻²²⁶
- PDGF, principalement stocké dans les α -granules plaquettaires, médiateur de la croissance et de la prolifération des fibroblastes médullaires.²²⁷ L'activation du récepteur PDGFR α sur les CSM LepR $^+$ induit leur expansion tandis que la signalisation de PDGFR β (dont l'expression sur les CSM de moelle est corrélée au grade de fibrose) est impliquée dans le développement de la fibrose.^{213,228}
- CXCL4 (PF4) (cf plus bas).^{214,229}
- VEGF (qui stimule l'angiogénèse médullaire).²³⁰
- Ostéoprotégérine (qui contribue à l'ostéosclérose médullaire).²³¹

Au contraire, l'interleukine (IL-10), dont le taux plasmatique est aussi augmenté chez les patients atteints de MF, possède une activité anti-inflammatoire et potentiellement anti-fibrosante, à l'image de ce qui est observé dans de nombreux modèles de fibrose d'organe.^{232,233}

2.3.1.2.5. Cellules du clone NMP inductrices de la fibrose médullaire dans les NMP

En cas de NMP, la fibrose médullaire est produite par des cellules stromales effectrices sous le contrôle de cytokines, de chemokines et d'interaction directes avec des cellules hématopoïétiques clonales.

Rôle du mégacaryocyte dans l'induction de la fibrose médullaire

De nombreux arguments font du mégacaryocyte la principale cellule inductrice de la fibrose médullaire en cas de NMP. Il s'agit d'abord d'arguments indirects :

- L'hyperplasie mégacaryocytaire est commune aux 3 NMP tandis que la dysplasie mégacaryocytaire est caractéristique de la MF (micromégacaryocyte, hypoploïdie).
- L'analyse transcriptomique à l'échelle unicellulaire des cellules Lin⁻ CD34⁺ montre une hématopoïèse biaisée vers le mégacaryocyte en cas de MF.²³⁴
- Chacune des mutations "driver" des NMP associés à une possible évolution fibrosante, implique la signalisation du récepteur MPL.
- Les modèles murins rétroviraux des 3 principales mutations (*Jak2* V617F, *Mpl* W515L, *Calr* Del52) induisent une MF secondaire qui n'est pas systématique dans les modèles KI, suggérant la nécessité d'une forte signalisation MPL pour induire une fibrose.²³⁵

Il s'agit aussi d'arguments plus directs. Ainsi, l'infection rétrovirale des cellules de moelle osseuse de souris avec le gène codant la TPO suivie d'une transplantation (modèle TPO^{high}) provoque une hyperplasie mégacaryocytaire puis une MF létale.^{32,236} Le traitement des souris par la TPO ou le romiplostim (agoniste de la TPO) à fortes doses induit le même effet. Les patients traités par romiplostim peuvent développer une fibrose médullaire corrélée à la dose et à l'intensité de la signalisation MPL/JAK/STAT, et réversible à l'arrêt du traitement.²³⁷

De plus, certains modèles murins impliquent le mégacaryocyte indépendamment de la signalisation MPL.

- La diminution de l'expression de *Gata1* provoque une accumulation de mégacaryocytes dans la moelle et la rate avec un blocage de la différenciation mégacaryocytaire (absence de formation de proplaquettes) et une MF au cours du vieillissement.²³⁸
- La perte de fonction d'*Abi-1* (codant une kinase régulant négativement *Abl1*) génère chez la souris une fibrose médullaire associée à une hyperplasie mégacaryocytaire.
- Les modèles associant *Jak2* V617F à une perte de fonction d'*Ezh2* ou d'*Asx1* présentent une hyperplasie mégacaryocytaire importante avec accélération du développement de la MF.^{151-153,156}
- Les modèles murin *Pf4-Cre*, dans lesquels l'expression de *Jak2* V617F est restreinte au lignage mégacaryocytaire, ne présentent pas ou très tardivement une MF, ce qui peut sembler contre-intuitif. La raison est que ces modèles développent une thrombocytose et

une hyperplasie mégacaryocytaire moins importantes que les modèles exprimant la même mutation dans l'ensemble du système hématopoïétique.^{120,239,240}

- Un dernier argument provient des résultats prometteurs d'une étude de phase I obtenus chez des patients MF en inhibant la kinase Aurora qui restaure la différenciation mégacaryocytaire et fait régresser la MF chez la majorité des patients.^{241,242}

L'ensemble de ces données plaide pour un lien entre hyperplasie mégacaryocytaire, défaut de maturation des mégacaryocytes et MF, et pose la question des mécanismes en cause. Là encore, on retrouve logiquement un rôle des cytokines sécrétées :

- Dès les années 1980, il avait été montré que le mégacaryocyte, en tant que principale source de PDGF, stimulait la prolifération fibroblastique et la sécrétion de collagène.²⁴³
- Le TGF- β 1, principale cytokine pro-fibrosante dans tous les tissus, est naturellement présent en grande quantité dans les α -granules des plaquettes
 - Des taux encore plus élevés de TGF- β 1 sont détectés dans les plaquettes et les mégacaryocytes des patients atteints de MF, comparés aux sujets sains.^{222,244}
 - Dans le modèle murin de MF induite par la TPO, l'hyperplasie mégacaryocytaire et la fibrose médullaire induite s'accompagnent de taux très élevés de TGF- β 1 dans le plasma, les plaquettes et la moelle osseuse.²²⁴
 - La transplantation de cellules de moelle de souris *tgfb1*^{-/-} infectées par le rétrovirus exprimant la TPO induit un NMP (hyperplasie mégacaryocytaire avec thrombocytose majeure) sans induire de fibrose médullaire.²²⁶ Cependant, cette étude ne démontre pas le rôle direct des mégacaryocytes dans la production de TGF- β 1.
 - Dans le modèle murin TPO^{high}, une analyse en microscopie électronique ne détecte pas de différence de quantité de TGF- β 1 stocké dans les α -granules des mégacaryocytes (ni de localisation intracellulaire de TGF- β 1) mais ces données ont été controversées.^{245,246}
 - Un excès de relargage du TGF- β 1 par les mégacaryocytes, qui surexpriment la P-selectine, serait dû à un excès d'empéripolèse des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles libérant leurs granules lytiques au contact des mégacaryocytes, qui à leur tour, relarguent le TGF- β 1 contenu dans leurs α -granules.^{245,247,248}
 - L'effet bénéfique de l'inhibition de la signalisation ALK5/Smad3 par le Galunisertib dans différents modèles murins de NMP plaide aussi pour un rôle important du TGF- β 1 dans le développement de la MF.²⁴⁹
- L'IL-6, présent en grande quantité dans le plasma des patients MF et des modèles murins de MF, est synthétisé, entre autres, par le mégacaryocyte. Son rôle direct dans la fibrose reste controversé : la MF est réduite lors de la transplantation de cellules de moelle de souris *il-6*^{-/-} infectées par le rétrovirus exprimant la TPO (modèle TPO^{high}) mais ne l'est pas lors de la transplantation de cellules médullaires exprimant *MPL* W515L dans un contexte *il-6*^{-/-}.^{221,229}
- CXCL4 (PF4), dont le taux plasmatique est augmenté chez les patients NMP, joue un rôle dans le développement de la fibrose dans de nombreux organes.^{250,251} CXCL4, majoritairement produite par les mégacaryocytes, induit la migration des cellule médullaires stromales Gli1⁺ et leur différenciation en myofibroblastes.²¹⁴ La délétion de

Cxcl4 dans le tissu hématopoïétique diminue la thrombocytose et l'apparition d'une MF dans les modèles rétroviraux TPO^{high}, JAK2 V617F et MPL W515L.²²⁹ La délétion de *Cxcl4* est associée à une diminution de la signalisation Stat1 dans les mégacaryocytes et à une diminution de la production d'IL-6. Toutefois, la surexpression de *Cxcl4* n'induit pas une MF.

Rôle du monocyte et du macrophage dans l'induction de la fibrose médullaire

Si le mégacaryocyte est une cellule initiateur de la MF, elle n'est pas la seule à induire des cellules effectrices.

Les monocytes et macrophages synthétisent et sécrètent du TGF- β 1. L'hyperplasie des mégacaryocytes est initialement associée à une prolifération granulo-monocytaire dans les modèles murins de MF comme chez l'homme. Les monocytes des patients MF produisent de grandes quantités d'IL-1 et de TGF- β 1 (sous sa forme inactive) après adhésion *in vitro*.²⁵² Toutefois, chez les souris NOD/SCID présentant un déficit fonctionnel des monocytes (notamment une incapacité à générer de fortes doses d'IL-1), de fortes doses de TPO génèrent une MF similaire à celle observée chez les souris sauvages, avec une augmentation du taux plasmatique de TGF- β 1. Ces données suggèrent que les monocytes ne jouent pas un rôle majeur dans le processus fibrotique médullaire.²⁵³

Le rôle attribué au fibrocyte, potentiellement issu de la différenciation d'un monocyte CD14⁺, en tant que cellule effectrice de la fibrose dans divers organes, a remis en selle le rôle du monocyte dans la génération de la fibrose médullaire. La moelle osseuse des patients atteints de MF présenterait de nombreux fibrocytes dérivés du clone malin et l'inhibiteur de pentraxin-2, ciblant le fibrocyte, permettrait de diminuer le développement de la fibrose médullaire dans un modèle de xénotransplantation.²¹²

Ces données restent controversées car les méthodes d'identification des cellules sont assez peu spécifiques. Cependant, une équipe japonaise a suggéré qu'une fraction des monocytes CD14⁺ exprime le récepteur MPL qui favorise cette différenciation des monocytes en fibrocytes.²⁵⁴ L'expression de MPL sur une fraction des monocytes a été validée depuis en cytométrie de masse, sur des cellules de sujets sains et de patients MF.²²⁰ Cette observation permettrait d'expliquer le rôle des monocytes dans la génération de la MF du modèle TPO^{high} mais ces données restent controversées en raison de la faible spécificité des anticorps anti-MPL utilisés et de la difficulté à définir un fibrocyte.

Ayant montré que les fibrocytes humains expriment à leur surface la molécule SLAMF7, l'équipe japonaise évoquée précédemment a montré que le pourcentage de monocytes SLAMF7^{high} était plus important chez les patients MF / JAK2^{V617F} comparés à des sujets sains, et que ce pourcentage était corrélé à la charge allélique JAK2^{V617F}. Un traitement par elotuzumab, un inhibiteur de SLAMF7, permettait d'inhiber la différenciation de ces monocytes SLAMF7^{high} en fibrocyte et de diminuer la fibrose médullaire dans un modèle de souris NOG humanisée traitée par fortes doses de romiplostim.²⁵⁵

Le monocyte reste donc potentiellement une cellule effectrice de la fibrose médullaire. Une régression de la fibrose médullaire après traitement par clodronate a été observée chez certains patients atteints de MF et le traitement par liposomes de clodronate dans le modèle de MF induit par romiplostim à forte doses permet de limiter significativement la formation d'une fibrose médullaire.²⁵⁴

Ces données font du macrophage, dont l'apoptose est déclenchée par cette classe de médicament, un potentiel acteur du développement de la fibrose médullaire.

Récemment, il a été montré que la transplantation de moelle de souris sauvage, exprimant le récepteur de la vitamine D ($Vdr^{+/+}$), à des souris $Vdr^{-/-}$ (ce qui provoque un taux élevé de vitamine D circulante), induit une fibrose médullaire impliquant les macrophages F4/80⁺ de la moelle du donneur et des myofibroblastes et ostéoblastes originaires de la souris receveuse.²⁵⁶ La même étude propose de cibler la vitamine D et ses voies de signalisation pour réduire la MF en bloquant la génération de macrophages médullaires, introduisant la vitamine D et le macrophage comme des acteurs jusqu'alors mal identifiés de la fibrose médullaire

En résumé, les mégacaryocytes et la cytokine TGF- β 1 sont des acteurs majeurs du développement d'une fibrose médullaire. L'importance de l'hyperplasie mégacaryocytaire et l'intensité de l'activation de la voie de signalisation MPL/JAK/STAT sont des facteurs corrélés à l'induction du phénomène fibrotique. D'autres cellules (monocytes, macrophages) et d'autres hormones et cytokines (dont la vitamine D) sont probablement impliqués dans le développement de la MF.

2.3.2. Transformation d'un NMP en leucémie aigüe myéloïde

2.3.2.1. Risque de transformation en LAM

Une LAM secondaire à un NMP est définie arbitrairement par la présence d'au moins 20% de myéloblastes dans le sang ou la moelle d'un patient atteint de NMP. Il est habituel de distinguer cette « LAM post-NMP » d'un « NMP en phase accélérée », défini par la présence de 10 à 19% de myéloblastes dans le sang ou la moelle. En pratique, un « NMP en phase accélérée » présente les mêmes caractéristiques et risques qu'une « LAM post-NMP ». Ces deux situations se distinguent des « LAM *de novo* » par la présence d'une dysplasie érythroïde et/ou mégacaryocytaire, de nombreuses anomalies cytogénétiques (reflet d'une instabilité chromosomique), de fréquentes mutations de *TP53* ou de gènes impliqués dans l'épigénétique (*IDH1/2*, *ASXL1*, *EZH2*) ou dans l'épissage (*SRSF2*) tandis que les mutations classiquement détectées dans les LAM *de novo* (*NPM1*, *FLT3*, *DNMT3A*) sont rares. Les mutations identifiées au moment de la transformation en LAM semblent dépendre du NMP : les mutations d'*ASXL1* ou de *SRSF2* sont plus fréquentes en cas de LAM post-PMF, celles de *TP53* en cas de LAM post-PV/TE.²⁵⁷

La transformation d'une TE en LAM est moins fréquente que l'évolution vers une myélofibrose puisque l'on estime ce risque entre 0,7 et 3,0% à 10 ans, entre 2,1 et 5,3% à 15 ans (globalement < 5% à 20 ans).¹⁸⁸ Les facteurs de risque associés à une évolution en LAM sont un âge avancé, une hyperleucocytose, une anémie, une thrombocytose extrême, une fibrose réticulinique et l'acquisition de certaines mutations somatiques, notamment des gènes *TP53* et *RUNX1*.¹⁹¹

Le risque de transformation en LAM d'une PV est, à l'instar du risque d'évolution myélofibrosante, plus élevé qu'en cas de TE. On estime ce risque entre 2,3 et 14,4% à 10 ans, 5,5 et 18,7% à 15 ans (globalement <10% à 20 ans). Ce risque augmente avec l'évolution de la maladie. Parmi les facteurs de risque identifiés, on retrouve l'âge avancé, l'hyperleucocytose et la fibrose réticulinique, auxquels s'ajoutent une splénomégalie et l'acquisition d'anomalies génétiques, notamment dans *TP53* et *RUNX1*.¹⁹¹ En revanche, la charge allélique JAK2 V617F ne semble pas corrélée au risque de transformation leucémique.

Le risque d'évolution d'une MF en LAM est plus élevé puisqu'il est estimé entre 10 et 20% à 10 ans. Certains paramètres cliniques et biologiques ont été associés à ce risque de transformation : âge >65 ans, signes constitutionnels, hémoglobine <10g/dL, hyperleucocytose >25G/L, blastes sanguins >1%.²⁵⁸ Le risque semble moins important dans les MF avec mutation *CALR* et plus élevé dans les MF « triple négatives ». ^{76,78} La présence (et le nombre) d'anomalies cytogénétiques ou de mutations supplémentaires (*TP53* notamment, *IDH1*, *IDH2*, *RUNX1*, *EZH2*, *ASXL1*, *SRSF2* et *U2AF1* également) est aussi associée à un risque accru.^{137,143,184}

Le pronostic à court terme d'un patient présentant une LAM post-NMP est redoutable puisque la survie médiane est inférieure à 6 mois.^{257,259} La présence d'une mutation du gène *TP53* ou du gène *SRSF2* confère, de manière indépendante, un pronostic encore plus grave.^{257,260}

2.3.2.2. Mécanismes impliqués dans le développement d'une LAM post-MPN

Les mécanismes par lesquels un NMP évolue en LAM sont complexes, multiples et mal compris. La présence de mutations supplémentaires, leur nombre et leur ordre d'apparition (par rapport aux mutations « driver » initiales) jouent très certainement un rôle.²⁶¹

L'étude de l'évolution clonale des NMP montre que le nombre de mutations secondaires acquises au cours du temps est faible. Dans un certain nombre de cas, ces mutations seraient présentes au moment du diagnostic.¹⁴³ Sachant que tous les patients NMP présentant des mutations supplémentaires ne développent pas systématiquement une LAM, ces mutations pourraient n'être que le reflet d'une plus grande instabilité génomique, l'émergence d'une LAM secondaire nécessitant beaucoup de temps ou un évènement complémentaire. Il a été proposé que l'ordre d'apparition des mutations complémentaires par rapport aux mutations principales (*JAK2*, *MPL*, *CALR*) joue un rôle dans l'avènement d'une LAM post NMP mais il n'existe pas d'étude étayant cette hypothèse.

Des modèles murins ont été générés pour tenter de comprendre le rôle des mutations complémentaires dans la leucémogénèse post-NMP. Les modèles murins associant *Jak2*^{V617F} à la délétion d'*Asx1*, d'*Ezh2* ou de *Tet2* révèlent une accélération du développement de la myélofibrose mais pas de la transformation en LAM. A l'inverse, les souris associant *Jak2*^{V617F} à une perte de fonction de *Tp53* développent une LAM létale.²⁶² Cependant, une étude réalisée chez 254 patients NMP a permis d'identifier une mutation de *TP53* (à de faibles taux pour la plupart) chez 20% d'entre eux, sans révéler d'excès de transformation en LAM associé à cette anomalie.²⁶³ Les patients présentant une mutation de *TP53* restent stables pendant des années, jusqu'au moment où survient une perte de l'allèle sauvage (par délétion, mutation ou recombinaison homologue) qui promeut l'expansion du clone et la transformation en LAM.¹⁴³ Le croisement des souris knock-in *Jak2*^{V617F} avec des souris knock-in *IDH1*^{R132H} ou *Idh2*^{R140Q} induit la transformation en LAM rapidement létale avec défaut de mégacaryopoïèse, expansion du pool des CSH et augmentation de leur capacité d'autorenouvellement.¹⁴⁸ Ces données suggèrent le rôle leucémogénique des mutations de *TP53* et d'*IDH1/2* dans les NMP avec mutation *JAK2*.

D'autres mécanismes ont été proposés pour expliquer la transformation d'un NMP en LAM. D'une part, l'hématopoïèse *JAK2* mutée sécrète du TNF α qui favorise l'expansion du clone muté au dépend de l'hématopoïèse sauvage.¹¹⁸ Cette synthèse autocrine de TNF α pourrait également favoriser la progression en LAM.²⁶⁴ D'autre part et de manière intrigante, une LAM post-NMP *JAK2*^{V617F} se développe fréquemment à partir d'une cellule hématopoïétique *JAK2* sauvage.^{265,266} Cette transformation semble plus fréquente chez les patients PV/TE que chez les patients MF.²⁶⁷ Ce

phénomène serait dû à la capacité des cellules JAK2^{V617F} d'induire de manière paracrine (via la sécrétion de lipocaline-2) un stress oxydatif et des dommages à l'ADN dans les cellules environnantes, qu'elles soient JAK2 sauvage ou muté.²⁶⁸

En résumé, la transformation d'un NMP en LAM est un évènement grave, plus fréquent dans la MF que dans la PV/TE, dont les mécanismes moléculaires complexes, impliquant évolution génétique clonale (TP53, IDH1/2) et mécanismes paracrines (TNF), ne sont que partiellement élucidés.

Objectifs du travail de thèse

L'acquisition d'une mutation de la proline 95 de la protéine SRSF2 au sein du clone d'un NMP est systématiquement associée à une diminution de l'espérance de vie et à un risque accru de transformation en LAM.

Les modèles murins *Srsf2*^{P95H} ont un phénotype discret, même si des transformations en NMP, voire en LAM ont été observées lors du vieillissement de ces animaux.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Chez l'homme, les mutations de *SRSF2* sont rarement isolées, y compris dans les clones de taille réduite définissant une CHIP (dans ce contexte, elles ne sont observées que chez les sujets les plus âgés).²⁶⁹ Ces données suggèrent que la mutation de *SRSF2* requiert un contexte spécifique (vieillesse, anomalies épigénétiques) pour perdurer au sein d'une population clonale. La coopération des mutations *Srsf2* et *IDH2* a été démontrée dans le développement d'une LAM.¹⁷⁸ Nous avons choisi d'explorer l'impact de la mutation de *Srsf2* dans un clone de MPN généré par la mutation « driver » *Jak2*^{V617F} sur l'évolution myélofibrosante et leucémique et la réponse au traitement.

Chez les patients NMP, la mutation *SRSF2*^{P95H} est majoritairement associée à la mutation *JAK2*^{V617F}, parfois à une mutation de *MPL*, exceptionnellement à une mutation de *CALR* (ces 2 mutations étant mutuellement exclusives pour une raison indéterminée).

Le variant *SRSF2*^{P95H} est rarement le seul variant associé à *JAK2*^{V617F} : dans près de 2/3 des cas, une troisième mutation est détectée et affecte les gènes *ASXL1*, *TET2* ou *IDH1/2*.¹³⁷ Etant donné l'impact respectif de chacune de ces autres mutations sur le phénotype de la maladie, il est très difficile d'établir la contribution de la mutation de *SRSF2* à l'évolution de la maladie. La modélisation des mutations *SRSF2*^{P95H} et *JAK2*^{V617F} dans le système hématopoïétique de la souris permet de s'affranchir des biais induits par les autres mutations sur le phénotype hématologique. A l'heure actuelle, il n'existe pas de données dans la littérature étudiant l'interaction entre ces 2 mutations dans ces conditions. Afin de s'affranchir du rôle potentiel de l'ordre d'apparition des mutations au sein du clone, nous avons mis en place un modèle murin dans lequel les 2 mutations sont inductibles simultanément.

Les résultats de l'analyse du modèle murin *Srsf2*^{P95H} permettait d'anticiper des défauts d'érythropoïèse et une augmentation du taux de plaquettes circulantes.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Le 1^{er} objectif de ce travail a été de décrire l'impact de *Srsf2*^{P95H} sur le phénotype *Jak2*^{V617F}, en particulier sur les populations érythrocytaire et plaquettaire.

L'incidence des variants de *SRSF2* est faible chez les patients atteints de PV/TE et plus importante chez les patients atteints de MF, sans que la contribution de cette mutation au processus fibrotique ait été solidement établie. Les études corrélatives réalisées chez l'homme donnent des résultats contradictoires.^{137,193,179,194,196} Le 2^{ème} objectif de ce travail de thèse a donc été d'explorer l'impact de *Srsf2*^{P95H} sur le développement de la fibrose induite dans le contexte *Jak2*^{V617F}.

Chez les patients NMP, la mutation *SRSF2*^{P95H} est clairement associée à un sur-risque de transformation en LAM. Ces LAM secondaires avec mutation *SRSF2*^{P95H} surviennent majoritairement dans le clone *JAK2*^{V617F} (et non dans un clone *JAK2* sauvage), observation en faveur d'une réelle interaction entre les 2 mutations au sein d'une même cellule pour promouvoir l'émergence d'une

LAM.^{257,270,271} Le 3^{ème} objectif de ce travail de thèse est d'établir l'impact d'une mutation de *Srsf2* sur le compartiment de CSH *Jak2*^{V617F} et son rôle dans la transformation en LAM.

Article de thèse

Differential effects of mutated SRSF2 on long term potential of JAK2V617F hematopoietic stem cells and myelofibrosis development

Christophe Willekens,^{1,2,12} Lucie Laplane,^{1,3} Tracy Dagher,¹ Camelia Benlabiod,¹ Catherine Lacout,¹ Philippe Rameau,⁴ Cyril Catelain,⁴ Alexia Alfaro,⁴ Valérie Edmond,¹ Nicolas Signolle,⁵ Aymeric Silvin,⁶ Florent Ginhoux,⁶ Valentine Marchand,¹ Nathalie Droin,^{1,7} Remco Hoogenboezem,⁸ Rebekka Schneider,^{8,9} Alex Penson,¹⁰ Omar Abdel-Wahab,¹⁰ Stephane Giraudier,¹¹ Caroline Marty,¹ Isabelle Plo,¹ Jean-Luc Villeval,¹ Françoise Porteu,¹ William Vainchenker,¹ Eric Solary.^{1,2,12}

1. INSERM U1287, Gustave Roussy Cancer Campus, 94800 Villejuif, France.
2. Département d'hématologie, Gustave Roussy Cancer Campus, 94800 Villejuif, France.
3. Institut d'Histoire et Philosophie des Sciences et des Techniques, Université Paris I Panthéon-Sorbonne, Paris, France.
4. UMS AMMICA- Plate-forme Imagerie et Cytométries, INSERM US23, CNRS UMS 3655, Gustave Roussy Cancer Campus, 94800 Villejuif, France.
5. Plateforme de pathologie expérimentale et translationnelle, UMS AMMICA, Gustave Roussy Cancer Campus, 94800 Villejuif, France.
6. INSERM U1015, Gustave Roussy Cancer Campus, 94800 Villejuif, France.
7. Genomic Core Facility UMS AMMICA, Gustave Roussy Cancer Campus, 94800 Villejuif, France.
8. Department of Hematology, Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands
9. Department of Hematology, Oncology, Hemostaseology, and Stem Cell Transplantation, RWTH Aachen University, Aachen, Germany.
10. Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA.
11. Hematology department, Saint-Louis Hospital, 75010 Paris, France.
12. Université Paris-Saclay, Faculté de Médecine, 94270 Le Kremlin-Bicêtre, France.

Correspondence to

Eric Solary
INSERM U1287
Pavillon de Recherche N°1
Gustave Roussy
114 rue Edouard Vaillant
94805 Villejuif, France
eric.solary@gustaveroussy.fr

Metrics: Abstract 197 words; Text 5,423;

Acknowledgments

We thank the engineers and technicians of Gustave Roussy research facilities for valuable technical support, including Laure Touchard, Mirile Ganga, Olivia Bawa, Hélène Rocheteau and Sylvie Souquere. We thank Richard Dyunga for animal genotyping and Inge Snoeren (Erasmus University Rotterdam) for nucleic acid extraction. We thank also Dorothée Selimoglu-Buet for helpful discussion. ES group is supported by grants from the Institut National du Cancer, Agence Nationale de la Recherche, Fondation ARC, Associations Laurette Fugain and Fondation AMGEN. The team is labeled by the Ligue

Nationale Contre le Cancer (F Porteu). C.W. received an MD/PhD track grant from the Philantropia Foundation.

Author contributions

CW performed and supervised all the experiments, TD, CB, CL, PR, CC, VE, NS, AS, VM, ND, CM performed experiments, LL, AA, RH and AP realized bioinformatic analyses, JLV and OAW provided mouse models, SG provided experimental samples, CW, RS, JLV, OAW, CM, IP, FP and WV analysed the data, ES designed and supervised the study and wrote the manuscript. All authors approved the manuscript.

Competing interest

The authors declare no competing interest.

Summary

Mutation in the splicing factor gene *SRSF2* associates with $JAK2^{V617F}$ in some myeloproliferative neoplasms (MPNs), most commonly primary myelofibrosis with a poor prognosis. To investigate how they interact in the hematopoietic tissue, we generated transgenic mice in which $Jak2^{V617F}$ and $Srsf2^{P95H}$ are expressed independently or simultaneously under control of the SCL promoter. $Srsf2^{P95H}$ showed initially limited impact on $Jak2^{V617F}$ -induced polycythemia. At later time points however, $Srsf2^{P95H}$ significantly delayed myelofibrosis. Serial transplantation experiments indicated that $Srsf2^{P95H}$ could prevent the exhaustion of $Jak2^{V617F}$ cells at the third transplant. $Srsf2^{P95H}$ had no significant impact on monocyte subset phenotype, but altered maturation of megakaryocytes (MK). Mass cytometry and RNA sequencing pointed to an impact of $Srsf2^{P95H}$ on JAK/STAT signaling in MKs and their progenitors. One of the mechanisms involved is the skipping of JAK2 exon 14 driven by mutated SRSF2. Our results unveil that mutated SRSF2 worsens MPN by increasing the long term potential of JAK2V617F hematopoietic stem cell, but unexpectedly has some protective effect of on myelofibrosis development by partially skipping the $Jak2$ pseudo kinase domain required for cytokine activation of JAK2. This suggests that targeting pre-mRNA splicing deserves to be explored as an innovative approach to target JAK2V617F-activated signaling.

Highlights

- *Srsf2*^{P95} mutation decreases *Jak2*^{V617F} HSC competitiveness but increase their fitness in serial competitive transplants.
- Co-occurrence of *Srsf2*^{P95} mutation limits *Jak2*^{V617F}-induced myelofibrosis by altering signaling pathway activation in JAK2^{V617F} megakaryocytes
- Altered signaling in SRSF2 mutated cells involves the enhanced skipping of JAK2 exon 14

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal diseases arising from a single, somatically mutated, hematopoietic stem cell (HSC). The most frequent phenotypic driver event identified in classical *BCR-ABL1*⁻ MPNs is a gain of function mutation in *JAK2*, *JAK2V617F*, that activates JAK-STAT signaling. Accordingly, *JAK2V617F* is the most prevalent driver mutation identified in primary or secondary myelofibrosis (MF) (Vainchenker W & Kralovics R, 2017).

The biological processes that lead to MF are influenced by the co-occurrence of additional somatic events that mostly affect genes encoding epigenetic regulators and splicing factors (Gangat N & Tefferi A, 2018). One of the most frequent somatic events associated with *JAK2V617F* in MF, detected in 12-20% of malignant cells, is the monoallelic somatic mutation affecting proline 95 residue in the splicing factor *SRSF2* (serine/arginine-rich splicing factor 2), a key protein of the spliceosome machinery (Tefferi A et al, 2016; Grinfeld J et al, 2018; Todisco G et al, 2020). Among MPNs, this event is almost exclusively associated with MF features, is more frequent in primary (17%, Lasho T et al, 2012) than secondary (Courtier F et al, 2019) MF, and correlates with a reduced MF-free survival in rare PV and ET in which it is detected (Lehman U et al, 2013; Barteks S et al, 2020). *SRSF2* mutation was associated with shorter leukemia-free and overall survival of MF patients (Lasho T et al, 2012; Courtier F et al, 2019; Vallapureddy RR et al, 2019). Accordingly, a higher risk gene expression signature was described in granulocytes of *SRSF2* mutated MF patients (Rontautoli S et al, 2021). As a consequence, mutation in *SRSF2* was included in the genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis (Tefferi et al, 2018).

Mouse models have depicted a cooperative effect of deletion in epigenetic regulators and activating mutation in *Jak2*, showing a synergistic contribution of gene deletion affecting the histone methyltransferase *EZH2* (enhancer of zeste homologue 2) (Shimizu T et al, 2016; Yang Y, Akada H, et al. Blood. 2016; Sashida G, Wang C, J Exp Med 2016) or the chromatin modifier *ASXL1* (additional sex combs-like 1) (Guo Y Leukemia 2019) or the DNA methyltransferase 3A *DNMT3A* (Jacquelin S et al, 2018) to *JAK2*^{V617F}-driven MPN development. In contrast, the cooperation between somatic mutation in a splicing factor and *JAK2V617F* activating mutation remains poorly understood.

Tissue fibrosis, which is induced by excessive formation and unstructured deposition of extracellular matrix (ECM) proteins such as fibronectin and collagen, is a pathophysiologic component of a wide range of diseases. This devastating scarring process, which disrupts organ architecture and impairs proper functions, is an exacerbated wound healing response driven by myofibroblasts (El Agha E et al, 2017; Weiskirchen R et al, 2019). These later cells are mostly generated through stimulation of perivascular, *Gli1*⁺ mesenchymal stem cells with fibrogenic soluble mediators (Kramann R et al, 2015), of which transforming growth factor beta 1 (*TGFβ1*) is a master component (Frangogiannis NG, 2020). Bone marrow cells, especially monocyte-derived cells, might diversely contribute to tissue fibrosis (Verstovsek S et al, 2016; Misharin AV et al, 2017). In the bone marrow, MF is associated with megakaryocyte (MK)-biased hematopoiesis, with MKs playing a central role in reprogramming bone marrow *Gli1*⁺ and leptin receptor⁺ (*LepR*⁺) mesenchymal stem cells into fibrosis driving cells through *TGFβ1* production (Wen QJ et al, 2015; Kramann R & Schneider RK, 2018; Psaila B et al, 2020).

In the present study, we crossed Cre-inducible *Jak2*^{V617F/+} (Hasan S et al, 2013) and *Srsf2*^{P95/+} (Kim E et al, 2015) knock-in conditional mouse models under *SCL* gene promoter in order to assess the functional consequences of co-occurring mutational events in hematopoietic cells. We observed an unexpected

delay in MF development. SRSF2P95H mutation interferes with JAK2V617F-induced abnormal maturation of MKs and decreases TGF β release, correlating with the negative regulation of several intracellular signaling pathways, which prevents MF. In competitive transplantation experiments, SRSF2P95H mutation decreases the fitness of JAK2V617F cells, nevertheless protects these cells from exhaustion induced by serial transplantation. These results indicate a complex interplay between JAK2V617F and SRSF2P95H, in which SRSF2P95H delays MF development but enhances the long term fitness of JAK2V617F mutated cells.

Results

The co-mutation of *Srsf2*^{P95H} delays *Jak2*^{V617F}-induced myelofibrosis.

Mice heterozygous for the *Srsf2*^{P95H} allele expressed from the endogenous murine locus (*Srsf2*^{P95H/+}; Kim E et al, 2015) were crossed with mice heterozygous for the *Jak2*^{V617F} allele (Hasan S et al, 2013) on a [C57BL/6](#) background to generate double mutant animals (**Supplemental figure 1A**). Single and double transgenic animals were crossed with mice expressing the tamoxifen-inducible Cre-ER^T recombinase under the control of the enhancer of the stem cell leukemia (*Scf*) locus (HSC-SCL-Cre-ER^T, herein referred to as SCL-Cre) (Göthert JR et al, 2015) on a [C57BL/6](#) background to allow for inducible expression of [Cre recombinase](#) following tamoxifen gavage. Bone marrow (BM) cells (3×10^6) collected from these strains were engrafted into lethally irradiated (9.5 Gy) congenic recipient mice (**Figure 1A**). Five weeks after transplantation, tamoxifen (10 mg/day for 2 days) was given to recipient mice.

Serial phlebotomies (180 μ L) performed every 2 weeks, which were used for peripheral blood cell monitoring, prevented mice expressing *Jak2*^{V617F} allele from dying within 8-16 weeks after initiation of tamoxifen (**Supplemental figure 1B**). Peripheral blood analyses showed an increase in hemoglobin level (**Supplemental figure 1C**), white blood cell count (**Supplemental figure 1D**) and platelet count (**Figure 1B**) as soon as 2 weeks after tamoxifen gavage in mice expressing *Jak2*^{V617F} allele. The increase in hemoglobin level and white blood cell count was significantly slow down by *Srsf2*^{P95H} co-mutation (**Supplemental figure 1C and 1D**). Among white blood cells, Ly6G⁺ neutrophils, Ly6G⁻/CD11b⁺ monocytes and total (CD3⁺, B220⁺ and NKP46⁺) lymphocytes were increased in mice expressing *Jak2*^{V617F} allele, with *Srsf2*^{P95H} co-mutation further increasing the number of neutrophils while decreasing the total lymphocyte count, reflecting a decrease in B220⁺ B-cell number (**Supplemental figure 1E**), as previously described in *Srsf2*^{P95H/+} animals (Kim E et al, 2015).

At later time points, while hemoglobin level (**Supplemental figure 1F**) and white blood cell count (**Supplemental figure 1G**) rising was still observed in all the animals expressing *Jak2*^{V617F} allele, the platelet count decreased in *Jak2*^{V617F} animals while being still rising in animals co-expressing *Srsf2*^{P95H} (**Figure 1C**). Bone marrow histopathology detected a decrease in cell number (**supplemental Figure 2A**) reflecting an increased reticulin fibrosis in *Jak2*^{V617F} expressing animals as soon as 8 weeks after initiation of tamoxifen gavage (**supplemental Figure 2B**), which further increased with time (16-24 weeks) (**Figure 1D**) and was significantly delayed by the co-expression of *Srsf2*^{P95H} (**Figure 1D and 1E**). *Srsf2*^{P95H} also reduced *Jak2*^{V617F}-induced splenomegaly and spleen fibrosis (**Supplemental Figure 2C**).

Measuring cytokine levels in the peripheral blood plasma of these animals 8 weeks after tamoxifen gavage, we detected a strong increase in TGF β 1 in *Jak2*^{V617F} expressing animals, which was significantly reduced by the co-expression of *Srsf2*^{P95H} (**Supplemental figure 2D**), an effect that was more significant

16 weeks later (**Figure 1F**). Analysis of other chemokines and cytokines, 8 weeks after tamoxifen, detected an increased plasma level of CXCL4, tumor necrosis factor- α (TNF α), interleukin-1 beta (IL-1 β), IL-4, IL-6, IL-10 and CXCL1/KC (Keratinocyte chemoattractant) in the plasma of *Jak2*^{V617F} expressing animals, with the co-expression of *Srsf2*^{P95H} significantly decreasing the overproduction of CXCL4, TNF α and IL-10 (**Supplemental figure 2D and 2E**). At a later time point, 24 weeks post-tamoxifen, we did not detect any change in circulating pentraxin-3 (PTX-3) (Veletic I et al, 2019) while osteoprotegerin (OPG) level was increased in *Jak2*^{V617F} expressing animals, whatever *Srsf2* status (**Supplemental Figure 2F**). Finally, the decrease in thrombopoietin (TPO) plasma level that was observed in *Jak2*^{V617F} mice, 24 weeks post tamoxifen, was further increased by *Srsf2*^{P95H} (**Supplemental Figure 2F**).

Together, this first series of experiments provided the unexpected observation that co-expression of *Srsf2*^{P95H} reduced rather than increased *Jak2*^{V617F} induced myelofibrosis.

***Srsf2*^{P95H} co-mutation modifies *Jak2*^{V617F} cell competitiveness.**

Analysis of hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow and spleen between 16 and 24 weeks after tamoxifen gavage of transplanted mice showed an increase in the fraction of LSK, MPP and SLAM in animals engrafted with *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} bone marrow cells compared to the others, without significant difference between those engrafted with *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} cells (**Figure 2A**). In competitive experiments in which CD45.1 mice were engrafted with an equal fraction of CD45.2 *Jak2*^{V617F} bone marrow cells expressing the green fluorescent protein (GFP) and CD45.2 GFP-negative *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} bone marrow cells (**Supplemental Figure 3A**), double mutant cells demonstrated a decreased competitiveness attested by the decreased fraction of GFP-negative SLAM in bone marrow analyzed 30 months after transplantation (**Supplemental Figure 3B**) and the time-dependent decrease in GFP-negative peripheral blood cells such as GFP-negative Ter119⁺ cells (**Supplemental Figure 3B**).

To further evaluate the impact of *Srsf2*^{P95H} co-mutation on *Jak2*^{V617F} cell competitiveness, 30% genetically modified cells were mixed with 70% wild-type cells expressing the green fluorescent protein (GFP) and transplanted in CD45.1 animals (**Figure 2B**). In accordance with previous report (Kim et al, 2015), *Srsf2*^{P95H} alone decreased cell competitiveness, as indicated by the rapid decrease in the fraction of GFP-negative cells in the peripheral blood, e.g. in the fraction of GFP-negative, Ter119⁺ cells (**Supplemental Figure 3D**). In contrast, *Srsf2*^{P95H} co-mutation only slightly delayed the increase in peripheral blood cells induced by *Jak2*^{V617F}, again illustrated by monitoring GFP-negative, Ter119⁺ cell fraction (**Supplemental Figure 3D**). Analysis of GFP-negative fraction among total bone marrow SLAM cells 24 weeks after tamoxifen gavage again demonstrated a dramatic decrease in the fraction of *Srsf2*^{P95H} cells while, in the same conditions, *Jak2*^{V617F} cells almost completely invaded the SLAM compartment, an effect that was significantly reduced by co-mutation of *Srsf2* (**Figure 2C**). However the *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} cells kept a competitive advantage on wild type cells. These mice were used to perform serial transplantation in CD45.1 animals (**Figure 2D**). Unexpectedly at the third transplantation of *Jak2*^{V617F}-containing bone marrow cells was associated with a significant reduction of engrafted animals when compared to those engrafted with *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} containing cells (**Figure 2E** (**Supplemental figure 3E**)). Analysis of the SLAM fraction in the bone marrow, 16 weeks after the third transplantation, indicated the disappearance of *Srsf2*^{P95H} alone and *Jak2*^{V617F} alone cells while *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} double mutants represented the great majority of SLAM cells (**Figure 2F**).

Accordingly, monitoring of peripheral blood cells 14 weeks after the third transplantation showed significantly higher blood cell counts in mice engrafted with bone marrow cells containing *Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}* compared to *Jak2^{V617F}* alone cells (**Figure 2G**).

Together, these results indicate that co-mutation in *Srsf2* preserves *Jak2^{V617F}* SLAMs from exhaustion induced by serial transplantation.

***Srsf2^{P95H}* co-mutation has no significant impact on *Jak2^{V617F}* monocyte subset repartition.**

To explore how *Srsf2^{P95H}* interferes with *Jak2^{V617F}*-induced MF, we analyzed the co-mutation impact on myeloid cell repartition in mouse peripheral blood and bone marrow samples collected from native animals, 3 weeks after tamoxifen gavage. After red blood cell lysis, residual peripheral blood cells were labeled with a panel of 29 antibodies recognizing hematopoietic cell surface markers (**Supplemental Table 1**) and analyzed by spectral flow cytometry. Having pooled the data from all the studied samples (**Figure 3A and supplemental figure 4A**), we excluded B220⁺ B cells, CD3⁺ T-cells, CD56⁺ NK cells and Ter119⁺ erythroid cells (together referred here to “Lin” markers) and subjected myeloid and Lin⁻ other cells to dimensionality reduction using the non-supervised UMAP algorithm (Becht et al, 2018). We identified populations of Ly6G⁺ neutrophils, Ly6C^{high} classical monocytes, Ly6C^{int} intermediate monocytes, Ly6C^{low} non classical monocytes, and CD11c⁺ dendritic cells, together with a residual population of “Lin⁺” cells (**Figures 3A**). Analysis and visualization, using UMAP dimensionality reduction to the cell surface marker (CD11a, CD117, CD41, MHCII, CXCR4, CD16/32, SLAMF7) expression datasets from *Scf-Cre*, *Srsf2^{P95H}*, *Jak2^{V617F}* and *Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}* uncovered limited differences in peripheral blood monocyte and neutrophil populations (**Figure 3A and 3B, supplemental Figure 4A-4D**). The repartition of classical, intermediate and nonclassical monocyte subsets was not significantly different between the four groups (**Figure 3B**), although CD11a⁺, Ly6C^{high}, MHC-II⁻ classical monocytes from *Jak2^{V617F}* and *Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}* demonstrated an increased labeling with CD41 targeting antibody, probably reflecting an increased number of platelets interacting with monocytes (**Supplemental Figure 4B**). Of note, an increase in the population of monocytes expressing high levels of signaling lymphocyte activation molecule SLAMF7 was described in the peripheral blood of patients with MF (Maekawa T et al, 2019). An increase in the population of monocytes expressing high levels of signaling lymphocyte activation molecule SLAMF7 could not be detected in the peripheral blood of *Jak2^{V617F}* and *Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}* animals (**Supplemental Figure 4C**) in contrast to what as been described in the peripheral blood of patients with MF (Maekawa T et al, 2019). Finally, only slight, non-significant changes in the expression of CD16/32 and CXCR4 were detected at the surface of circulating Ly6G⁺ cells of *Jak2^{V617F}* and *Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}* neutrophils (**not shown**).

The same labeling and analysis strategy was applied to bone marrow samples (**Figure 3C and supplemental figure 5**). Dimensionality reduction using the non-supervised UMAP algorithm to classify myeloid and “Lin⁻” (Ter119⁻, B220⁻, CD3⁻, CD56⁻) cells identified Ly6G⁺ granulocytes, Ly6C^{high} classical monocytes, Ly6C^{low} non-classical monocytes, CD34⁺ cells, LK (Lin⁻, c-Kit⁺) cells, CD41⁺/CD42⁺ megakaryocytes, CD11c⁺ dendritic cells and MHC-class II macrophages (**Figure 3C**). The most striking differences identified by cell surface analysis and visualization of cell surface markers were in CD41⁺/CD42⁺ megakaryocytes, including CD117⁺, CD150⁺ megakaryocyte progenitors, whose fraction seemed to be increased in Lin⁻ cells from *Jak2^{V617F}* and, to a lesser extent, from *Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}* mice as compared to *Scf-Cre* or *Srsf2^{P95H}* animals (**Figure 3D**). We also noticed in the bone marrow an increased fraction of Ly6G⁺ cell subset expressing CXCR4 (**Figure 3E**), which was not observed in the peripheral blood (not shown). Again, the repartition of monocyte subsets, as defined by Ly6C

expression level in CD11a⁺ cells, was not significantly different between mouse strains, and the increased expression of CD41 observed at the surface of circulating classical monocytes (**Supplemental figure 4B**) was not observed in the bone marrow (**Supplemental figure 5B**). Further analysis of bone marrow cell populations did not detect any significant changes in CD16/32⁺, SLAMF7⁺ macrophages (**Supplemental figure 5C, upper panel**), whereas the fraction of CD117⁺, CD16/32⁺ granulomonocyte progenitors (GMP) was increased in *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} mice as compared to *Scl-Cre* or *Srsf2*^{P95H} animals (**Supplemental figure 5C, lower panel**).

Altogether, the most striking event identified by spectral flow analysis of peripheral blood and bone marrow Lin⁻ cells was an increased fraction of megakaryocytes and their CD117⁺, CD150⁺ progenitors in the bone marrow of *Jak2*^{V617F} mice, which was still observed but suspected to be less important in *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} animals.

***Srsf2*^{P95H} interferes with *Jak2*^{V617F}-induced alterations in megakaryocytes**

These results led us to further explore the mutation impact on megakaryopoiesis. We first quantified megakaryocytes by von Willebrand factor (vWF) staining on bone marrow sections collected from transplanted mice, 8 weeks post tamoxifen. As expected, *Jak2*^{V617F} induced an increase in the number of bone marrow megakaryocytes as compared to *Scl-Cre* and *Srsf2*^{P95H}-transplanted animals, without significant impact of concomitant *Srsf2*^{P95H} mutation (**Figure 4A**). This increase in the number of megakaryocytes was associated with an increase in cell size that was significantly less important in double-mutant compared to *Jak2*^{V617F} animals (**Figure 4B**). Electron microscopy did not detect ultrastructural modifications of megakaryocytes according to their mutational status (**Supplemental Figure 6A**), but analysis of megakaryocyte ploidy demonstrated that *Srsf2*^{P95H} co-mutation decreased the effects of *Jak2*^{V617F} on ploidy correlating with the changes observed in MK size (**Figure 4C and supplemental Figure 6B**).

At later time points, 16-24 weeks post tamoxifen, the megakaryocyte number measured in vWF-stained bone marrow remained increased in both *Jak2*^{V617F} alone and *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} animals as compared to *Scl-Cre* and *Srsf2*^{P95H} mice, but this number was decreasing with time in *Jak2*^{V617F} alone mice while remaining high in double-mutant mice (**Figure 4D and supplemental Figure 6C**). This evolution correlated with the changes observed in platelet count between *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} compared to *Jak2*^{V617F} mice. It correlated also with an increased fraction of megakaryocyte erythroid progenitors (MEPs) and megakaryocyte progenitors (MKPs) in the bone marrow and the spleen of double mutant compared to *Jak2*^{V617F} animals (**supplemental Figure 6D**), and with the ploidy that was decreasing more rapidly in *Jak2*^{V617F} compared to *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} megakaryocytes (**Figure 4E**). Finally, the relocalization of vWF-positive megakaryocytes close to the bone induced by *Jak2*^{V617F} was prevented by the *Srsf2*^{P95H} co-mutation (**supplemental Figure 6E**).

These results reveal that *Srsf2*^{P95H} negatively interferes with *Jak2*^{V617F} induced dynamic changes in bone marrow megakaryocyte number and maturation

***Srsf2*^{P95H} down-regulates intracellular signaling**

Megakaryopoiesis regulation involves the thrombopoietin receptor MPL and the downstream JAK/STAT signaling pathway. Flow cytometry analysis of MPL expression at the surface of bone marrow CD41⁺ / CD42d⁺ cells collected 8 weeks after tamoxifen gavage, indicated that *Srsf2*^{P95H} alone did not alter MPL expression as compared to *Scl-Cre* mice, and confirmed the previously described decrease in MPL expression at the surface of *Jak2*^{V617F} cells (Pecquet C et al, 2012). Interestingly, this effect was

partly corrected by *Srsf2*^{P95H} co-mutation (**Figure 5A**). We then performed mass cytometry analysis of bone marrow cells collected from transgenic animals only 3 weeks after tamoxifen feeding. Focusing on lineage negative (Ter119⁻, CD3⁻, B220⁻, Gr1⁻, CD11b⁻) cells, we pooled samples with at least 20,000 events and subjected them to dimensionality reduction according to surface markers CD45, Sca1, C-kit, CD48, CD150, CD41, CD42 and Mpl using the non-supervised UMAP algorithm clustered (Becht et al, 2018) (**Supplemental Figure 7A and 7B**). Having separated samples by genotype, we did not detect any significant difference in MKP and MK fractions, even though *Jak2*^{V617F}-induced increase in peripheral blood platelet count was already detected and slightly delayed by *Srsf2*^{P95H} co-mutation at this early time point (**Supplemental Figure 7C**). We applied non-supervised UMAP algorithms to explore the intracellular expression of P-STAT1, P-STAT3, and P-STAT5 in megakaryocyte progenitors (**Supplemental Figure 7D**; Lin⁻, c-Kit⁺, CD150⁺, CD41⁺) and mature megakaryocytes (**Supplemental Figure 7E**, Lin⁻ CD41⁺ CD42d⁺) respectively. We detected a higher proportion of megakaryocyte progenitors and megakaryocytes with intense P-STAT5 (>5.10¹), which was slightly reduced in animals with concomitant *Srsf2*^{P95H} mutation (**Figure 5B and 5C**). We also validated the decreased expression of Mpl in *Jak2*^{V617F} MKs (**Supplemental Figure 7F**). Of note, P-STAT1 was hardly detected while no significant difference in P-STAT3 intensity could be detected in Lin⁻ cells among studied genotypes (not shown).

To further explore the impact of genotype on MPL signalling, we used another previously described mouse model of myelofibrosis induced by iv administration of high dose romiplostim, a thrombopoietin receptor agonist (Maekawa T et al, 2017). Animals were engrafted with either *Scl-Cre* or *Srsf2*^{P95H} bone marrow cells. Three weeks after tamoxifen gavage, they received 3 weekly administration of high dose romiplostim (1 mg/kg/day) (**Figure 5D**). Romiplostim induced a rapid increase in the peripheral blood platelet count, which was significantly less important in *Srsf2*^{P95H} engrafted animals (**Figure 5E**). All the *Scl-Cre* engrafted animals developed a myelofibrosis that was reduced in *Srsf2*^{P95H} engrafted animals (**Figure 5F and 5G**), an effect that was also observed in the spleen (**Figure 5H**).

These results indicated that *Srsf2*^{P95H} negatively interfered with MPL signaling, which may account for the phenotypic modifications of megakaryocytes and the decreased myelofibrosis observed in *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} when compared to *Jak2*^{V617F} animals.

***Srsf2*^{P95H} co-mutation with *Jak2*^{V617F} down-regulates signaling pathways in megakaryocytes.**

We also performed RNA sequencing analysis of MKs sorted from *Scl-Cre*, *Srsf2*^{P95H}, *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} mouse bone marrow. We first assessed overall similarity between samples. Unsupervised hierarchical clustering separated *Scl-Cre* from *Jak2*^{V617F} cells, whatever the *Srsf2* status. Distance values show high similarity between *Scl-Cre* and *Srsf2*^{P95H} samples and more heterogeneity among *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} samples (**supplemental figure 8A**). Similar observation where made using dimensionality reduction through principal component analysis (PCA) (**supplemental figure 8B**). Accordingly, pairwise differential analyses consistently showed a high impact of *Jak2*^{V617F} on gene expression in MKs while changes induced by *Srsf2*^{P95H} mutation were more limited, which is illustrated by the Set Size of the upset plot, the largest intersection between differentially-expressed genes (DEGs) of the six pairwise analyses (1,194 genes) being across the samples with *Jak2*^{V617F} mutation (**supplemental figure 8C**). When compared to *Scl-Cre* MKs, we observed that *Srsf2*^{P95H} mutation changes the expression of a limited number of genes (n=75) while

this number was closed to or higher than 3,000 when *Jak2*^{V617F} was expressed, without or with *Srsf2*^{P95H} (**supplemental figure 8D**).

MKs of double-mutant *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} mice clustered separately from single mutant *Jak2*^{V617F} cells in PCA (**Figure 6A**), even though analysis of DEGs identified only 71 DEGs between these two conditions (**Figure 6B**). Heatmap of the expression of these DEGs in the four mice groups with unsupervised hierarchical clustering shows that a high proportion of them are genes that are up-regulated by *Jak2*^{V617F}, while their expression in *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} MKs is similar to Scl-Cre MKs, also attested by the grouping of *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} MKs with Scl-Cre and *Srsf2*^{P95H} MKs (**Figure 6C**). To further explore how *Srsf2*^{P95H} mutation impacts *Jak2*^{V617F} MKs, we performed pathway analysis using gene set enrichment analysis (GSEA), identifying the enrichment of *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} compared to *Jak2*^{V617F} cells in cell cycle related pathways (MYC and E2F targets), contrasting with the down-regulation of signaling (TNF α , TGF β , IFN γ , JAK-STAT, KRAS) pathways (**Figure 6D**). Comparison of enrichment scores further confirmed the upregulation of signaling pathways with *Jak2*^{V617F} mutation and partial correction when *Srsf2*^{P95H} is interfering (**Figure 6E**). Genes defining changes in these signaling pathways showed minor overlap, except for those of the hallmark IL-6_JAK_STAT3 signaling that overlapped with all the other pathways (**Supplemental Figure 8E**). Looking at the top 50 DEGs of IL-6_JAK_STAT3 signaling pathway in the four mouse models, we observed that *Srsf2*^{P95H} mitigated the expression of most of the up-regulated genes upon *Jak2*^{V617F} expression (**Figure 6F**).

Together, these results suggested the ability of *Srsf2*^{P95H} mutation to interfere with multiple signaling pathways in megakaryocytes, including those activated by *Jak2*^{V617F}

In parallel, we performed RNA sequencing analysis of previously described Lin⁻ bone marrow cells. Given the heterogeneity of these cells, we compared cells of the four mouse models by using CellRadar software that compares the expression of lineage-associated genes according to BloodSpot database. As illustrated on **supplemental figure 9**, genes upregulated in cells expressing *Jak2*^{V617F} with or without *Srsf2*^{P95H} are mostly impacting the erythroid and megakaryocyte lineages whereas downregulated genes mostly define granulocytic, monocytic and lymphocytic lineages.

***Srsf2*^{P95H} promotes the abnormal splicing of *Jak2* exon 14.**

Analysis of a solution structure of SRSF2 splicing factor in complex with RNA indicated that this protein could recognize both CCNG and GGNG sequences (Daubner et al, 2012). Using RNA sequencing data from sorted megakaryocytes, we compared the relative enrichment of all four SSNG variants, where S represents C or G, in cassette exons that were differentially spliced upon expression of mutant *Srsf2*^{P95H}, in the context of wild-type or mutated *Jak2*. MKs expressing *Srsf2*^{P95H} either alone or in combination with *Jak2*^{V617F} exhibited enrichment for CCNG and depletion for the other sequences, especially GGNG, in exons that were included versus excluded, respectively (**Figure 7A**). Since our pathway analysis identified defective signaling in *Srsf2*-mutated *Jak2*^{V617F} MKs, we looked for alternative splicing events in *Jak2*, identifying potential changes in *Jak2* exon 13 and/or exon 14 skipping in cells expressing *Srsf2*^{P95H} alone or combined with *Jak2*^{V617F} (**Figure 7B, supplemental table X**). We focused on the abnormal splicing of *Jak2* exon 14, which encodes the pseudokinase domain including Valine 617, validating this exon skipping by isoform specific RT-qPCR in mouse bone marrow cells (**Figure 7C**) by showing the abnormal splicing of a fraction of *Jak2* exon 14 when *Srsf2* is mutated (**Figure 7D and 7E**). This splicing variant of JAK2 had been detected in the granulocytes of patients with a myelofibrosis (Ma W et al, 2010; Catarsi P et al, 2015). Here, by performing exon 14 isoform specific

RT-qPCR in peripheral blood granulocytes sorted from patients with JAK2 V617F myelofibrosis, with (n=2) and without (n=2) *SRSF2*^{P95} mutation (n=2), we detected this exon 14 skipping variant in the cells of the two patients with *SRSF2* mutation, not in those of the two others (Figure 7F). Together, mutated *SRSF2* may generate a small but detectable amount of JAK2 mRNA isoform deleted from exon 14, which may contribute to the downregulation of intracellular signaling.

Discussion

While the deletion of an epigenetic regulator, including *Ezh2*, *Asx1* and *Dnmt3a*, synergistically cooperates with *Jak2*^{V617F} through various mechanisms to exacerbate MF in mice (Shimizu T et al, 2016; Yang Y, Akada H et al., 2016; Sashida G et al, 2016; Guo Y et al, 2019; Jacquelin S et al, 2018), a mouse model exploring the consequences of *Srsf2*^{P95H} mutation on *Jak2*^{V617F}-induced phenotype suggests a more complex interplay in which *Srsf2* mutation delays the development of MF, which is associated with the down-regulation of several intracellular signaling pathway in MKs, while increasing the fitness of mutated cells in serial transplantation experiments.

Both monocyte-derived cells and MKs were involved in the development of tissue fibrosis. Depletion of circulating monocytes (Moore et al, 2001; Gibbons et al, 2011; Ozono Y et al, 2021) and genetic manipulation impairing their differentiation into tissue macrophages (Misharin AV et al, 2017, Wakahashi et al, 2019) could reduce fibrosis severity in several tissues including the bone marrow. Upon stimulation with TGFβ, circulating monocyte subsets can differentiate into fibrocytes (Maekawa T et al, 2019; Manshoury T et al, 2019; Ozono Y et al, 2021) or into macrophages that stimulate the proliferation of myofibroblasts (Wakahashi et al, 2019). In the models studied here however, neither the number of circulating monocytes, which increased upon *Jak2*^{V617F}, nor the repartition of monocyte and monocyte-derived cells in the bone marrow, were affected by *Srsf2*^{P95H} (Maekawa T et al, 2019). The increased fraction of classical monocytes labeled with anti-CD41 antibody may be related to platelet surface abnormal galactosylation (di Buduo CA et al, 2021). We cannot rule out an impact of *Srsf2*^{P95H} on *Jak2*^{V617F} bone marrow macrophage metabolism and functions (Fidler TP et al, 2021), or the overproduction of TNFα by a subset of monocytes ((Fleischman AG et al, 2011; Satoh T et al, 2017) as *Srsf2*^{P95H} slightly reduce TNFα circulating level and the TNFα via NFκB pathway in megakaryocytes. Of note, a strong upregulation of this pathway was detected when *dnmt3a* gene was deleted in *Jak2*^{V617F}, a model of co-mutation that promotes MF (Jacquelin S et al, 2018). Other circulating cytokines were involved in MF (Tefferi A et al, 2011; Fisher DAC et al, 2019). Spatial expression of the pro-fibrotic chemokine CXCL4 (chemokine C-X-C motif ligand 4) / platelet-factor-4 (PF4), whose serum level is decreased by *Srsf2*^{P95H}, marks the progression of MF (Schneider RK et al, 2017 ; Gleitz H et al, 2020). The decrease in IL-10 serum level in *Srsf2* co-mutated animals mimics a previously reported effect of the JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib (Kleppe M et al, 2015). Finally and most importantly, *Srsf2* co-mutation decreases the circulating level of TGF-β1, which was extensively implicated in the pathogenesis of tissue fibrosis (Fava RA et al, 1990 ; Martyre MC et al, 1991). Together, *Srsf2* co-mutation attenuates the profibrotic cytokine climate generated by JAK2^{V617F}.

Abnormal MKs are other critical drivers of bone marrow fibrosis, *i.e.* they reprogram hematopoiesis supporting cells to fibrosis-driving cells (Kramann R, Schneider RK, 2018) and targeting megakaryocytes ameliorates myelofibrosis in preclinical models and early phase clinical studies (Elliades A et al, 2011;

Wen QJ et al, 2015; Gangat et al, 2019). Recent investigation at the single cell level identified the aberrant differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) toward MKs with a dramatic expansion of MKs progenitors exhibiting an abnormal gene signature associated with fibrosis and proliferation (Psaila B et al, 2020). Accordingly, mouse models of MPNs expressing *Jak2*^{V617F} showed an increased proportion of MK-biased CD41^{high} HSPCs (Rao TN et al, 2021). Aberrant MK number, differentiation, location and function was associated with a significant reduction of GATA1 protein expression (Gilles et al, 2017), the overexpression of the anti-apoptotic protein Bcl-X_L (Masselli E et al, 2015; Ciurea SO et al, 2007), and irregular production of fibrogenic cytokines including TGFβ (Gersuk GM et al, 1989; Martyré MC et al, 1997; Di Raimondo F et al, 2001; Ciurea SO et al, 2007; Decker M et al, 2017; Malara et al, 2018; Kramer F et al, 2020) and IL-6 (Woods B et al, 2019). The present study validates the abnormal maturation of *Jak2*^{V617F} megakaryocytes and a protective effect of *Srsf2*^{P95H} that, without restoring a wildtype phenotype, attenuates the phenotypic alterations induced by *Jak2*^{V617F}, including TGFβ overproduction.

Both STAT3 and STAT5 are activated downstream of c-MPL and JAK2 in megakaryocytes and they are commonly activated in human MPNs (Benekli M et al, 2003), mice deficient for both STAT5A and STAT5B are thrombocytopenic (Snow JW et al, 2002), and transgenic expression of a dominant negative STAT3 mutant delays platelet recovery after myelosuppression (Kirito K et al, 2002). Regardless of their clinical phenotype, all MPN patients demonstrate a JAK-STAT pathway activation signature in their granulocytes (Rampal R et al, 2014) with some differences in signaling output between genotype subtypes (Sakr H et al, 2018). STAT3 and STAT5 are both required in mouse models of *Jak2*^{V617F} induced MPNs (Yan D et al, 2012; Walz C et al, 2012) and their target genes are up-regulated in JAK2-mutant MKs (Lau WWY et al, 2015), whereas STAT1 could be dispensable, at least in a *Jak2*^{exon12} model (Grisouard J et al, 2016). The deregulated activation of additional signaling pathways, including MAPK and PI3K pathways, was identified in JAK2^{V617F}-mutated MKs (Grimwade LF et al, 2009; Desterke C et al, 2011; Rampal R et al, Blood 2014; Talpaz M & Kiladjian JJ, 2021). Our investigations point to a decreased activation of STAT5 in megakaryocytes and their progenitors when *Srsf2*^{P95H} is co-expressed with *Jak2*^{V617F}.

The decreased expression of the thrombopoietin receptor MPL at the surface of MKs and platelets is an established feature of MF (Pecquet C et al, 2012, Sangkhae V et al, 2014). Our finding that *Srsf2*^{P95H} partially restores the expression of Mpl at the surface of MKs argues for an interference of the co-mutation with JAK2^{V617F} signaling. The delayed induction of thrombocytosis and MF by romiplostim observed in mice engrafted with *Srsf2*^{P95H}-mutated mice compared to those engrafted with wild-type mice further argue of a negative impact of *Srsf2*^{P95H} on MK signaling, downstream of MPL.

Proline 95 mutation in *Srsf2* alters the RNA binding specificity of the protein and generates mis-spliced transcripts (Kim E et al, 2015 ; Zhang J et al, 2015; Kon A et al, 2018; Smeets MF 2018; Lee SC et al, 2018). Here, we show that *Srsf2*^{P95H} mutation impacts JAK2 pre-mRNA splicing by skipping exon 14. Deletion of JAK2 exon 14 was identified as a minor splice variant of JAK2 (~12% of JAK2 mRNA) in a fraction of patients with primary MF (Ma W et al, 2010). A direct role of JAK2^{V617F} in this effect was excluded (Nauroy et al, 2014; Catarsi P et al, 2015). *Jak2* exon 14 encodes the JAK-homology 2 (JH2) domain, a catalytically inactive, pseudokinase domain in which is located the valine residue 617. This domain both suppresses basal JAK2 activity in the absence of cytokine stimulation and is required for induction of maximal JAK2 activation, *i.e.* to render JAK2 responsive to cytokine stimulation with increased activity (Saharinen P et al, 2002; Saharinen P et al, 2003). Thus, JAK2 exon 14 skipping

induced by *Srsf2*^{P95H} may contribute to decrease JAK/STAT signaling. Modulation of JAK/STAT activity by alternative splicing was already described, e.g. alternative splicing of protein-tyrosine phosphatase 1B was shown to augment JAK/STAT activity in classical Hodgkin lymphoma cells (Zahn M et al, 2017).

The poor competitive engraftment potential of *Srsf2*^{P95H} murine models is lost when competitor cells are age- and microenvironment-matched (Smeets MF 2018). Generated in a transplanted SCL-Cre driven model, our results indicate that *Srsf2* mutation initially decreases the competitiveness of *Jak2*-mutated cells, nevertheless increases the HSC ability to serially engraft by preventing their exhaustion. This effect on the *Jak2*^{V617F} HSC coupled to the ability of mutated SRSF2 to promote the formation of R-loops (Chen L et al, 2018; Nguyen HD et al, 2018) that could potentially generate additional somatic mutations may contribute to the decreased leukemia-free and overall survival observed in JAK2-mutated MF patients co-expressing a mutated SRSF2.

Together, we have depicted an antagonist interaction between *Jak2*^{V617F} and *Srsf2*^{P95H} when co-expressed in the hematopoietic system. By decreasing intracellular signaling, including the characteristic activation of JAK/STAT pathway, in *Jak2*^{V617F} cells, *Srsf2* mutation attenuates the profibrotic behavior of megakaryocytes. One of the mechanisms involved is the abnormal splicing of JAK2 exon 14 containing the pseudokinase domain. Based on these results, modulation of mRNA splicing would deserve to be tested as an alternative to kinase inhibitors to down-regulate intracellular signaling in JAK2^{V617F} cells and prevent or delay bone marrow fibrosis development.

Materials and methods

Animal models and transplantation

Animal experiments were conducted in Gustave Roussy animal facility and approved by the ethical review board (#2016–104-7171). All mice were kept under specific pathogen–free conditions with free access to food and water, housed under 12-hour light/12-hour dark cycles, with monitored ambient temperature (21 ± 1 °C) and humidity range (20–70%), in accordance with French laws for animal welfare.

Transgenic mice expressing a Cre-recombinase–inducible *Jak2*^{V617F} (Hasan S. et al., 2013) were crossed with transgenic mice expressing a Cre-recombinase–inducible *Srsf2*^{P95H} (Kim E. et al., 2015) to generate double mutant mice on a C57BL/6 background. These animals were crossed with *Scl-Cre*^{ERT} transgenic animals (Göthert et al., 2005) to generate offsprings in which tamoxifen could trigger the expression of heterozygous *Jak2*^{V617F}, heterozygous *Srsf2*^{P95H} or the two mutated alleles.

In transplant experiments, recipient mice were 8-week old C57BL/6 females (Envigo Labs, www.envigo.com) intravenously engrafted with 3×10^6 bone marrow cells after lethal irradiation (9.5Gy). In a first series of competitive transplantations, 0.9×10^6 whole BM cells collected from CD45.2, *Scl-Cre*^{ERT}, *Jak2*^{V617F}, *Srsf2*^{P95H} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} mice were mixed with 2.1×10^6 bone marrow cells from CD45.2 *Ubi-GFP* transgenic mice (Schaefer B.C. et al.; 2001) (ratio 30% GFP⁻ / 70% GFP⁺) and engrafted in lethally irradiated CD45.1 recipient animals (Jackson Labs, www.jax.org). In a second series of competitive transplantations, 1.5×10^6 GFP-labeled, *Jak2*^{V617F} bone marrow cells, obtained by crossing *Scl-Cre*^{ERT} \times *Jak2*^{V617F} mice with *Ubi-GFP* transgenic mice, were mixed with 1.5×10^6 GFP-negative, *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} bone marrow cells and engrafted into CD45.1 recipient mice (purchased from Jackson Labs). In all these experiments, recombinase Cre expression was induced 5 weeks after transplantation by tamoxifen gavage (500mg/kg/day for 2 days). Serial transplantations were generated by injecting 3×10^6 whole bone marrow cells collected at indicated time points into CD45.1 recipient mice, without further tamoxifen feeding. Peripheral blood cells were monitored every 2 weeks on samples collected on citrate, using an automated counter (MS9; Schloessing Melet). Bone marrow cells were collected at sacrifice by flushing femurs and tibias whereas spleens were weighed before preparing single-cell suspensions.

Romiplostim-induced myelofibrosis

Three weeks after tamoxifen induction of transgene expression, heterozygous *Srsf2*^{P95H} and *Scl-Cre* mice were administered 1 mg/kg romiplostim (Nplate, Amgen) by subcutaneous injection on day 1, day 8 and day 15 as described (Maekawa T et al, 2017). Platelet count, white blood cell count and hemoglobin level were recorded on day 1, 8 and 15. At day 21, mice were sacrificed to measure bone marrow cellularity and spleen weight and to explore the presence of reticulin fibers (Gordon and Sweet's silver staining) and vWF+ megakaryocytes in the bone marrow and the spleen.

Histopathology

Sternum and spleen were fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified, and paraffin-embedded, and sections were stained with hematoxylin and eosin while megakaryocytes were labeled with rabbit anti-von Willebrand factor. Reticulin fibrosis was quantified by computer-assisted image study. Bone marrow sections were digitally scanned with an Olympus VS120 slide scanner at 20X magnification. Five representative areas (0.15mm^2) were selected, bone area possibly included in the image was manually discarded. Area of black pixels (i.e., reticulin positivity) was calculated using a macro written

in NIH's ImageJ software. More precisely, the Luminance component is extracted and thresholded using Maximum Entropy threshold. Fitratio eliminates objects < 5 pixels, circularity > 0.8, brightness > 150, and hue < 150. The five areas are added and weighted to determine an objective numerical quantification of reticulin staining. We also measured the distance from vWF+ megakaryocytes to endosteum using NIH's ImageJ software. Color deconvolution (with Fast Red/Fast Blue/DAB vectors) was applied before segmenting the DAB component with Maximum Entropy threshold. Further mathematical morphology tools (fill holes, watershed, filtering of small objects) were applied to enhance detection and the edges of endosteum were manually delineated. A distance map to these edges was computed and the distance to the closest endosteum was measured for each megakaryocyte.

Cytokine quantification

Whole peripheral blood was obtained at sacrifice through cardiac puncture and centrifuged at 2,200 rpm for 20 minutes before collecting the serum that was aliquoted and stored at -80°C. TGF-β1, CXCL4, thrombopoietin serum levels were measured in duplicates using ELISA on EnSpire Multimode Plate Reader from PerkinElmer. Serum levels of IFNγ, IL-10, IL-12p70, IL-1β, IL-4, IL-5, IL-6, KC and TNFα concentrations were measured in duplicates using the Vplex Proinflammatory panel-1 mouse kit (Meso Scale Discovery, www.mesoscale.com). Acquisitions and analyses were performed on a MESO QuickPlex SQ120 reader and the MSD's Discovery Workbench 4.0.

Standard flow cytometry

After red blood cell lysis, peripheral blood cells were labeled with PE-CF594-conjugated anti-CD45 (clone 30-F11; BD), BV421-conjugated anti-CD3 (clone 500A2; BD), BV510-conjugated anti-B220 (clone RA3-6B2; BD), FITC-conjugated anti-NKP46 (clone 29A1.4; BD), APC-Cy7-conjugated anti-Ly6G (clone 1A8; BD), PE-conjugated anti-CD11b (clone M1/70; Biolegend) and APC-conjugated anti-Ly6C (clone HK1.4; Biolegend). Bone marrow and spleen cell suspensions were stained with a cocktail of lineage-markers (PE-conjugated anti-CD3/anti-B220/anti-Ter119/anti-CD11b/anti-Mac1), PE-Cy7-conjugated anti-Sca-1 (clone D7; Biolegend), APC-conjugated anti-Kit (clone 2B8; BD), FITC-conjugated anti-CD34 (clone RAM34; BD), BV421-conjugated anti-CD16/32 (clone 93; Biolegend), APC-Cy7-conjugated anti-CD48 (clone HM48-1; Biolegend), PE-dazzle594-conjugated anti-CD150 (clone TCF15-12F12.2; Biolegend) and BV510-conjugated anti-CD41 (clone MWReg30; Biolegend). To identify more mature hematopoietic cells, 5×10^6 bone marrow or spleen cells were incubated with purified anti-CD16/32 antibody (clone 2.4G2; BD) and stained with BV605-conjugated anti-Ter119 (clone TER-119; BD), PE-Cy7-conjugated anti-CD71 (clone RI7217; Biolegend), BV510-conjugated anti-CD41 (clone MWReg30; Biolegend), PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD42d (clone 1C2; Biolegend), PE-CF594-conjugated anti-CD45 (clone 30-F11; BD), APC-Cy7-conjugated anti-Ly6G (clone 1A8; BD) and PE-conjugated anti-CD11b (clone M1/70; Biolegend).

MPL expression on megakaryocytes was detected by sorting Lin⁻ (Ter119, CD3, B220, Cd11b and Gr1-negative) bone marrow cells by immunomagnetic negative selection (IMag; BD Biosciences), then incubating cell suspension with anti-CD16/32 antibody (clone 2.4G2; BD), then BV510-conjugated anti-CD41 (clone MWReg30; Biolegend), APC-conjugated anti-CD42d (clone 1C2, Biolegend) and biotin-conjugated anti-MPL (clone AMM2, IBL Tecan), the fixation of this latter antibody being secondarily revealed using BB515-conjugated streptavidin.

In competitive transplant, GFP⁺ cell chimerism was explored by incubating 1 μ L peripheral blood without red blood cell lysis with BV605-conjugated anti-Ter119 (clone TER-119; BD). After RBC lysis, blood samples were incubated with purified anti-CD16/32 antibody (clone 2.4G2; BD) and labelled with BV711-conjugated anti-CD45.1 (clone A20; Biolegend), BV785-conjugated anti-CD45.2 (clone 104; Biolegend), APC-Cy7-conjugated anti-Ly6G (clone 1A8; BD), PE-conjugated anti-B220 (clone RA3-6B2; Biolegend), PE-conjugated anti-NKP46 (clone 29A1.4; Biolegend), PE-conjugated anti-CD3 (clone 500A2; Biolegend) and PE-Dazzle594-conjugated anti-CD11b (clone M1/40; Biolegend).

At sacrifice, BM and spleen cells were stained with BV711-conjugated anti-CD45.1 (clone A20; Biolegend), BV785-conjugated anti-CD45.2 (clone 104; Biolegend), PE-conjugated anti-Lin⁺ (Biolegend), PE-Cy7-conjugated anti-Sca1 (clone D7; Biolegend), APC-conjugated anti-Kit (clone 2B8; BD), APC-Cy7-conjugated anti-CD48 (clone HM48-1; Biolegend), PE-Dazzle 594-conjugated anti-CD150 (clone TC15-12F12.2; Biolegend) and BV510-conjugated anti-CD41 (clone MWReg30; Biolegend). Analyses of all these experiments were performed on an LSRFortessa (BD) and results were analyzed using Kaluza Analysis software (Beckman Coulter).

Spectral flow cytometry

Bone marrow cells (10^6 cells after centrifugation) and peripheral blood cells (10^6 cells after red blood cell lysis) were fixed with Cytodelics Stabiliser for 10 minutes and stored at -80°C . After washing, cells were resuspended in 100 mL extra-cellular antibody cocktail (**Supplemental table 1**) and incubated at room temperature for 15 min. After incubation, cells were washed in Flow Cytometry Buffer (1% BSA, 0.5% Na-Azide and 0.5M EDTA in PBS) and resuspended to proceed to the acquisition. Samples were acquired on CyTEK Aurora flow cytometer (Cytek Biosciences). FCS files were exported and analyzed using FlowJo software.

Mass cytometry

Bone marrow megakaryocytes were analyzed by mass cytometry in engrafted mice that were sacrificed 3 weeks after tamoxifen feeding. The experiment was performed at $+4^{\circ}\text{C}$ using diluted 1/100 phosphatase inhibitor cocktail-2 aqueous solution (www.SigmaAldrich.com). After bone centrifugation, Lin⁻ cells were enriched from bone marrow cell suspension by immunomagnetic negative selection (IMag; BD Biosciences, www.bdbiosciences.com) using Ter119, CD3, B220, Cd11b and Gr1 antibodies. Dead Lin⁻ cells were stained with cisplatin and washed in RPMI. Cell suspension was incubated in Maxpar Cell Staining Buffer and stained with surface antibodies (CD45, Sca-1, cKit, CD48, CD150, CD34, CD135, CD41, MPL, CD42d, CD3, B220, Gr-1, CD11b; **supplemental table 1**). After 1h at 4°C , cells were washed and fixed with formaldehyde 1.6% for 15 minutes and permeabilized with methanol. Cell suspension was stained 1h at $+4^{\circ}\text{C}$ with intracellular antibodies (P-STAT5, P-STAT3, STAT3, P-STAT1, P-Akt, P-Erk1/2, Ki67; **supplemental table 1**), washed, and further stained 20 minutes at ambient room temperature with iridium containing intercalation solution and stored overnight after washing. Cells were resuspended in Maxpar Cell Acquisition Solution at 0.5×10^6 / mL and mixed with 10% EQ Beads immediately before acquisition on Helios mass cytometer using noise reduction, event length limits of 10-150 pushes. At least 500,000 events were acquired per sample at a flow rate of 0.03 mL/min. Mass cytometry standard files were normalized to a global standard determined for each log of EQ beads using CyTOF Software v.6.7.1014 (Fluidigm). Fcs files were exported using FlowJo software. Marker expression values were transformed using the arcsin transformation function. FlowSOM clustering was performed using 9 markers for lineage-negative cells, 7 markers for MKP cells and 5

markers for MK cells. Then, UMAP were run with a nearest neighbor of 15 and a min_distance of 0.2. Clusters in Lin⁻ cells were identified by the detection of commonly used cell markers.

Megakaryocyte polyploidisation

Bone marrow cells were labeled with BV510-conjugated anti-CD41 (clone MWRReg30; Biolegend) and APC-conjugated anti-CD42d Abs (clone 1C2, Biolegend). After hypotonic cell permeabilization with 0.1% sodium citrate, DNA content was stained with 50 µg/mL propidium iodide and treated with 50 µg/mL RNAase (both from www.SigmaAldrich.com). Ploidy was measured by flow cytometry in CD41⁺ CD42⁺ cell population by means of a LSRFortessa (Becton Dickinson) with a BD FACSDiva software. Data were analyzed with Kaluza Analysis software (Beckman Coulter). The mean ploidy was calculated in $\geq 8N$ MKs $[(8N \times \text{number of cells at } 8N + \dots + 64N \times \text{number of cells at } 64N) / \text{total number of cells}]$.

Transmission electron microscopy

Bone marrow carrots were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer for 1 hour at 4°C and were postfixed with 2% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer for 1h at room temperature. Following dehydration through a graded ethanol series, samples were embedded in Epon™ 812. Polymerization was complete after 48 h at 60 °C. Analysis of the cellular organization of the bone marrow at the optical level was performed on 1 µm semi-thin sections. Mounted on a microscope slide, these sections were de-embedded for 20 min at room temperature by immersion in ethanol saturated with sodium hydroxide and stained with a 1% aqueous solution of thionine blue for 30 min at 56°C. After washings in absolute ethanol and xylene, the sections were mounted with Eukitt mounting medium (EMS). Ultrathin sections were stained with standard uranyl acetate and lead citrate and observed with FEI Tecnai 12 electron microscope (FEI, Eindhoven, Netherlands). Digital images were taken using a SIS MegaviewIII CCD camera (Olympus, Tokyo, Japan).

Bulk RNA sequencing

Bone marrow megakaryocytes were sorted from *recipient* mice 8-12 weeks after tamoxifen feeding. Lin⁻ cells were enriched by immunomagnetic negative selection (IMag; BD Biosciences) using Ter119, CD3, B220, Cd11b and Gr1 antibodies before being labeled with PE-conjugated anti-CD41 (clone MCRReg30, BD) and APC-conjugated anti-CD42d (clone 1C2, Biolegend) antibodies. CD41⁺ CD42d⁺ cells were sorted using Influx 5 laser BD cell sorter in Trizol LS and stored at -80°C. RNA isolation was performed using RNA isolation protocol with chloroform and GenElute LPA (Sigma) protocol. Paired end sequencing was performed on Illumina Novaseq. Resulting base-calls were converted to fastq files using Illumina bcl2fastq (v2.20.0.422). Quality metrics and summary was constructed using fastqc and multiqc, and SMARTer adapters and poly-a tails were removed using fqtrim. (v0.9.7.) Abundance estimation was directly performed on the trimmed fastq files using Salmon (0.13.1). Batch effects were corrected using ComBat-Seq (Zhang Y, Parmigiani G et al, 2020) in the sva library (v3.34.0) in the R environment (R 3.6.2). Low-expressed genes with a total read count lower than 10 were discarded. Identification of differentially expressed genes (DEGs) and principle component analysis (PCA) were performed using deseq2 (1.26.0). PCA and Euclidean distance heatmap were performed after regularized log transformation to ensure roughly equal contribution from all genes. PCA were performed on the 500 most variable genes. Heatmaps were performed using ComplexHeatmap (v2.2.0) on differentially expressed genes (DEGs) with a padj < 0.05. Volcano plots were done using EnhancedVolcano (v1.4.0), with the same padj threshold. Venn diagrams were drawn with eulerr library (v6.1.0). Enrichment analyses were performed with clusterProfiler (v3.14.3), with ranking based on the stat column, with number of permutation fixed at 10,000 and pvalue cutoff at 0.05. The results

were plotted with enrichplot (v1.6.1). Splicing defects were identified with rMATS v4.1.0 (<https://www.pnas.org/content/111/51/E5593>) using the Ensembl GRCm38 release 101 annotation. Reads that do not cross an exon boundary were used as well as reads that span junctions. SSNG_score was calculated for each exon by the sum of: +1 for each CCNG, +0.5 for each GCNG, 0.5 for each CGNG and -1 for each GGNG. This is multiplied by 4 (the number of bases in the motif) and divided by the length of the exon to give the SSNG%.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from sorted CD41⁺ CD42d⁺ megakaryocytes in TRIzol solution (ThermoFisher, Scientific, www.thermofisher.com/fr). RNA was extracted from TRIzol using Direct-zol RNA Microprep (Zymo Research; www.zymoresearch.com). One hundred ng of total RNA was reverse transcribed using SuperScript™ IV VILO Master mix with ezDNase enzyme (Thermo Fisher Scientific). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was performed with AmpliTaq Gold polymerase in an Applied Biosystems 7500 thermocycler using the standard SyBR Green detection protocol as outlined by the manufacturer (Thermo Fisher Scientific). Briefly, 12 ng of total cDNA, 50nM (each) primers, and 1× SyBR Green mixture were used in a total volume of 20 µL. Jak2 exon14 skipping (NM_008413) was analyzed using Jak2_e13_F: 5'-CTAGATAAAGCACATAGGAACTATTCA-3' and Jak2_e15_R: 5'-CTTCAGGTATGTATCCAGTGATCCAA-3' primer set. Melting curve profiles were used to visualize exon-14 skipping (amplicon with exon-14: 171 bp; amplicon without exon-14: 83 bp) and the amplicons were separated in a 2% agarose gel.

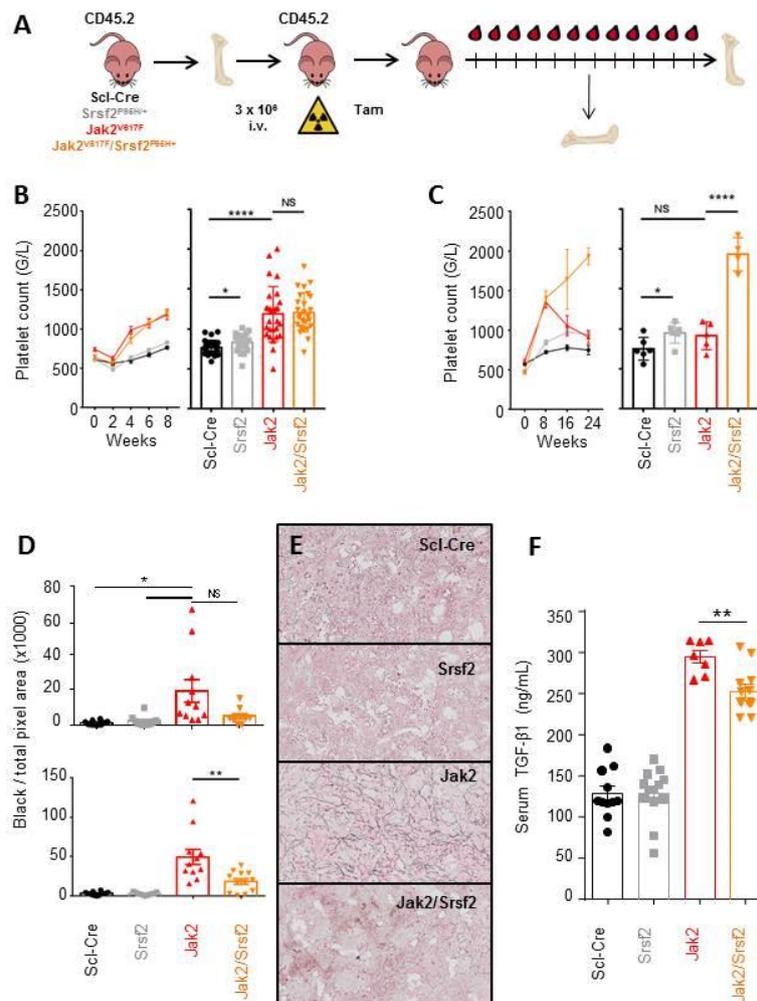
Statistical analysis

All the results are shown as means ± SEM. To assess the statistical significance among individual cohorts, one-way ANOVA with subsequent Bonferroni's post-hoc multiple comparison test or unpaired Student's *t* test was used (Prism version 7 software; GraphPad Software). $P \leq 0.05$ was considered significant. In all figures, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and **** $P < 0.0001$.

Figure legend

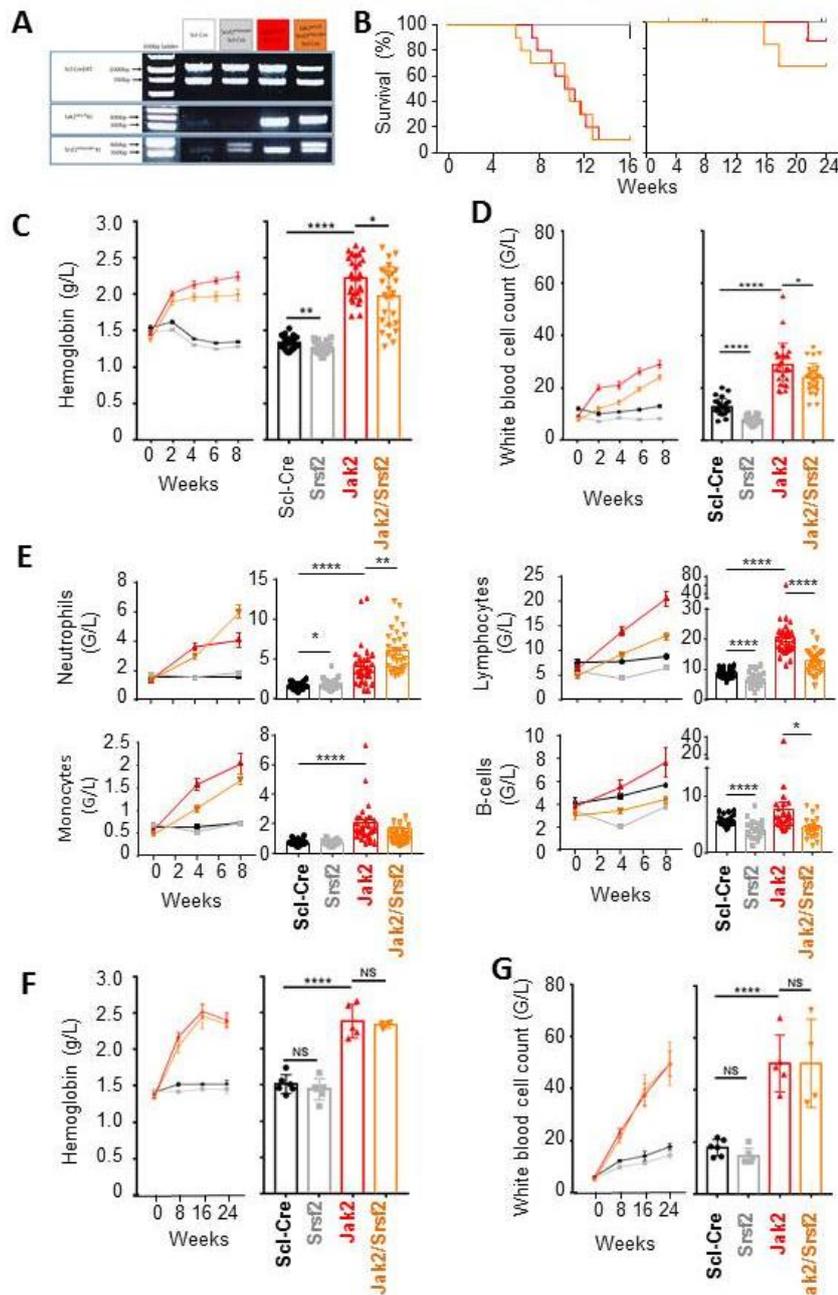
Figure 1. Co-mutation of *Srsf2*^{P95H} delays *Jak2*^{V617F}-induced myelofibrosis. **A.** Bone marrow cells (3×10^6) from SCL-Cre mice, either crossed or not with knock-in mice for *Srsf2*^{P95H}, *Jak2*^{V617F} or the two mutated alleles, were engrafted into lethally irradiated congenic recipients, 5 weeks before tamoxifen gavage (10 mg/day, 2 days). Phlebotomies (180 μ L) were performed every 2 weeks of up to 24 weeks. **B, C.** Peripheral blood platelet count at indicated time points after tamoxifen gavage. **B,** results collected from 3 independent experiments, mean \pm SEM of *Scl-Cre* (n=25), *Srsf2*^{P95H} (n=26), *Jak2*^{V617F} (n=27), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=26); **C,** results collected from 1 experiment, mean \pm SEM of *Scl-Cre* (n=5), *Srsf2*^{P95H} (n=6), *Jak2*^{V617F} (n=5), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=4). Statistical analysis, unpaired t-test, * P<0.05, **** P<0.0001, NS not significant. **D.** Bone marrow reticulin fibrosis quantified by computer-assisted imaging, 16-24 weeks after tamoxifen gavage. Results collected from 2 independent experiments, mean \pm SEM of *Scl-Cre* (n=10), *Srsf2*^{P95H/+} (n=10), *Jak2*^{V617F} (n=11), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H/+} (n=10); unpaired t-test. * P < 0.05, ** P < .01, NS not significant. **E.** Representative reticulin fiber staining (Gordon and Sweet's and von Willebrand Factor staining) in bone marrow examined 24 weeks after tamoxifen from indicated genotypes (magnification x 25). **F.** Serum concentration of TGF β 1 measured by ELISA 24 weeks after tamoxifen. *Scl-Cre* (n=11), *Srsf2*^{P95H/+} (n=13), *Jak2*^{V617F} (n=7), *Jak2*^{V617F} *Srsf2*^{P95H/+} (n=12). unpaired t-test. ** P < 0.01.

Christophe Willekens et al, Figure 1



Supplemental figure 1. A. Genotyping of double-mutant *Srsf2*^{P95H}/*Jak2*^{V617F} mice; **B.** Overall survival of *Scl-Cre* (black), *Srsf2*^{P95H} (gray), *Jak2*^{V617F} (red) and *Srsf2*^{P95H}/*Jak2*^{V617F} (orange) mice without (left panel) and with (right panel) phlebotomy every 2 weeks; **C,D.** Hemoglobin level (**C**) and white blood cell count (**D**) at indicated time points after tamoxifen gavage (left panel) and at 8 weeks post-tamoxifen (right panel); 3 independent experiments are pooled, mean +/- SEM of *Scl-Cre* (n=25), *Srsf2*^{P95H} (n=26), *Jak2*^{V617F} (n=27), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=26); **E.** CD45⁺, SSC^{high}, Ly6G⁺ neutrophils, CD45⁺, Ly6G⁻, CD11b⁺ monocytes, total lymphocytes (including CD3⁺, B220⁺ and NKP46⁺ cells) and B220⁺ B-cells at indicated time points after tamoxifen gavage (left panel) and 8 weeks post-tamoxifen (right panel); 3 independent experiments are pooled, number as in C,D; **F,G.** Hemoglobin level (**F**) and white blood cell count (**G**) at indicated time points after tamoxifen gavage (left panel) and 24 weeks post-tamoxifen (right panel); one experiment is shown, mean +/- SEM of *Scl-Cre* (n=6), *Srsf2*^{P95H} (n=6), *Jak2*^{V617F} (n=5), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=4); All panel, unpaired t-test. * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, **** P < .0001. NS, not significant.

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 1



Supplemental figure 2. A. Bone marrow cellularity per leg in mice after long term follow-up (16-24 weeks after Tamoxifen induction); mean +/- SEM is shown. **B.** Bone marrow reticulin fibrosis as quantified by histological grading, 8 weeks (upper pane) and 16-24 weeks (lower panel) after tamoxifen gavage. Results collected from 2 independent experiments, mean +/- SEM of *Scl-Cre* (n=14), *Srsf2*^{P95H} (n=14), *Jak2*^{V617F} (n=13), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H/+} (n=16); **C.** Spleen weight (upper panel) and spleen fibrosis grading (lower panel) 16-24 weeks after tamoxifen gavage; 4 independent experiments are pooled, *Scl-Cre* (n=15), *Srsf2*^{P95H} (n=15), *Jak2*^{V617F} (n=14), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=14). **D.** Plasma concentration of TGF- β 1 as measured by ELISA, 8 weeks post-tamoxifen in indicated mice E. TNF, IL-1 β , IL-6, IFNg, IL-4, IL-10, KC, IL-5 and IL-12p70 serum level was measured by Vplex 8 weeks post-tamoxifen in indicated animals; *Scl-Cre* (n=9), *Srsf2*^{P95H/+} (n=10), *Jak2*^{V617F} (n=10), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H/+} (n=10) F. Pentraxin-3 (PTX3), osteoprotegerin (OPG) and thrombopoietin (TPO) plasma levels were measured 24 weeks after tamoxifen gavage; *Scl-Cre* (n=6), *Srsf2*^{P95H/+} (n=4), *Jak2*^{V617F} (n=6), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H/+} (n=6); all experiments, unpaired t-test. * P < .05, ** P < .01, *** P < .001, **** P < .0001; NS, not significant.

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 2

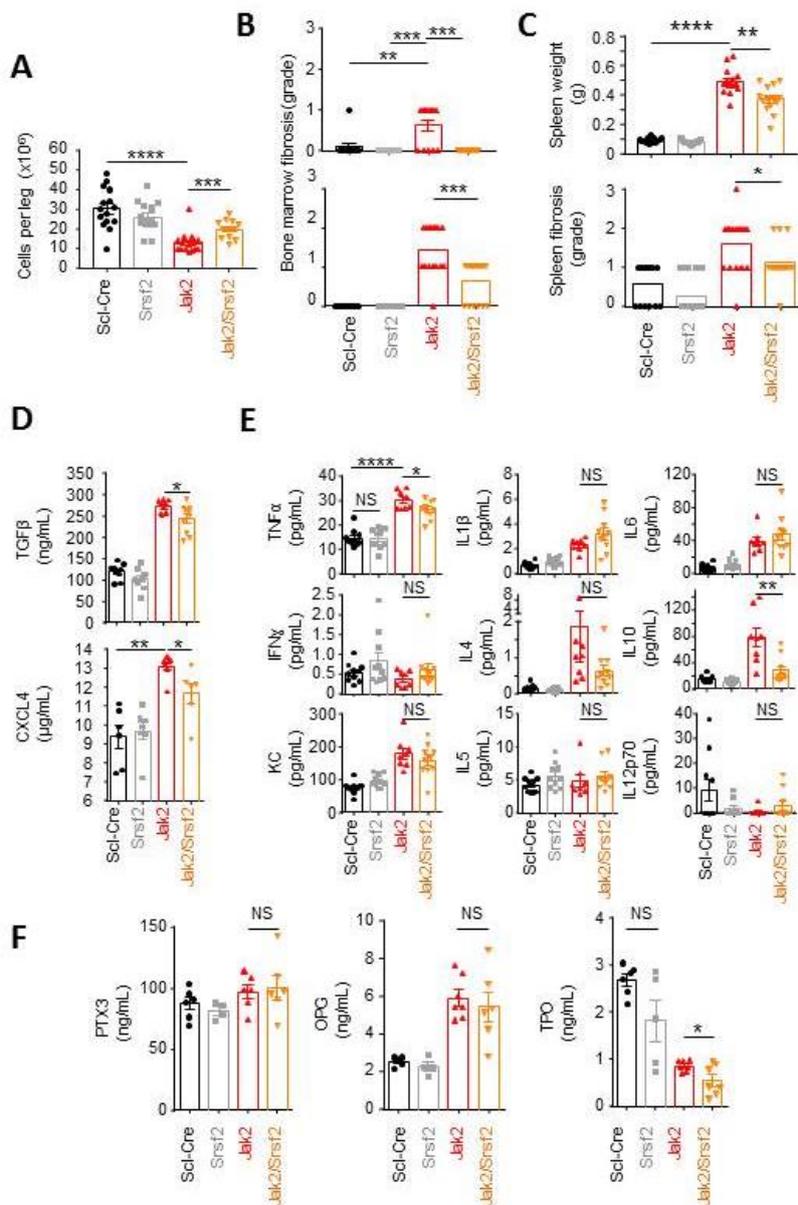
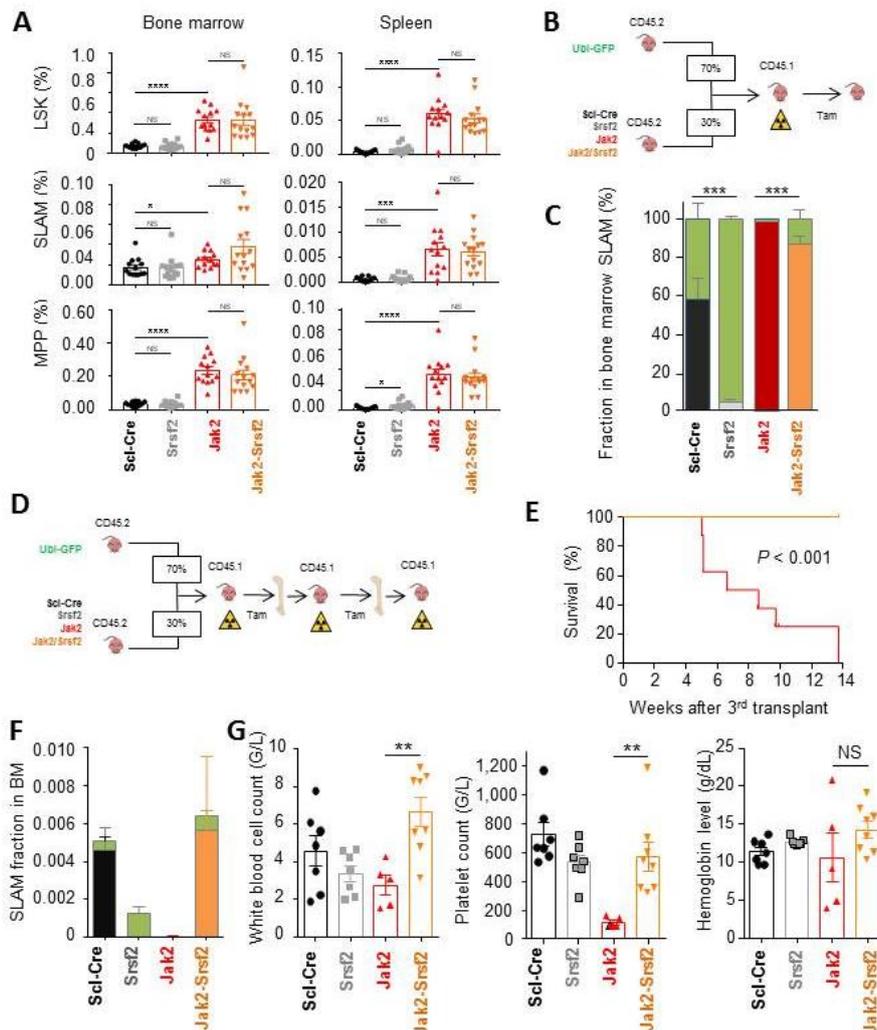


Figure 2: *Srsf2*^{P95H} co-mutation reduces *Jak2*^{V617F} cell competitiveness.

A. Bone marrow cells were engrafted as in Figure 1A; flow cytometry measurement of LSK (Lin⁻, Sca1⁺, cKit⁺), SLAM (LSK, CD48⁻, CD150⁺) and MPP (LSK, CD48⁺, CD150⁻) fractions in bone marrow and spleen collected from indicated mouse strains, 16-24 weeks after tamoxifen gavage; pooled analysis of 2 experiments : *Scl-Cre* (n=13), *Srsf2*^{P95H} (n=13), *Jak2*^{V617F} (n=13), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=14); **B.** A mixture of whole bone marrow cells collected from one of the indicated CD45.2 mouse strains (0.9 x 10⁶, 30%) and CD45.2 *Ubi-GFP* transgenic mice (2.1 x 10⁶, 70%) were engrafted into lethally irradiated CD45.1 recipients, 5 weeks before tamoxifen gavage (10 mg/day, 2 days); **C.** Flow cytometry measurement of bone marrow GFP⁺ (shown in green) and GFP⁻ (colors of indicates strains) CD45.2⁺ SLAM repartition in the bone marrow, 24 weeks after tamoxifen gavage; n=7 mice per group, mean +/- SEM; **D.** Following a first transplantation as in panel B, bone marrow cells (3x10⁶) were serially transplanted into CD45.1 mice (second transplantation, 24 weeks after tamoxifen gavage; third transplantation 16 weeks after transplantation); **E.** Overall survival of mice after the third transplantation with *Jak2*^{V617F} (in red) and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (in orange) containing bone marrow cells. *Jak2*^{V617F} (n=8), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=8); **F.** Flow cytometry measurement of bone marrow GFP⁺ (shown in green) and GFP⁻, CD45.2⁺ SLAM fraction among bone marrow cells in sacrificed animals; **G.** Peripheral blood white blood cell count, platelet count and hemoglobin level following the third transplantation, 16 weeks after transplantation (except *Jak2*, last blood cell analysis before death); *Scl-Cre* (n=7), *Srsf2*^{P95H} (n=7), *Jak2*^{V617F} (n=5), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=8); mean +/- SEM; All panel, unpaired t-test. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, **** P < 0.0001. NS, not significant.

Christophe Willekens et al, Figure 2



Supplemental Figure 3: *Srsf2*^{P95H} co-mutation reduces *Jak2*^{V617F} cell competitiveness. **A. A mixture of whole bone marrow cells collected from 45.2 *Jak2*^{V617F}-GFP (1.5×10^6 ; 50%) and 45.2 *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (1.5×10^6 ; 50%) mouse strains were engrafted into lethally irradiated CD45.1 recipients, 5 weeks before tamoxifen gavage (10 mg/day, 2 days); serial blood sampling was performed every 2 weeks for 30 weeks. **B.** Fraction of GFP⁻ SLAM in the bone marrow of engrafted mice (n=4), before and 30 weeks after tamoxifen gavage. **C.** Time-dependent evolution of GFP⁻ fraction among total Ter119⁺ cells in the peripheral blood of mice transplanted as in panel A. Mean +/- SEM of 4 animals. **D.** Time-dependent evolution of GFP⁺,Ter119⁺ cells among total Ter119⁺ cells in the peripheral blood of mice transplanted with 70% *Ubi*-GFP and 30% GFP-negative cells collected from *Scl*-Cre (black), *Srsf2*^{P95H} (gray), *Jak2*^{V617F} (red) and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (orange) animals (n=7 per group); unpaired t-test comparing *Srsf2*^{P95H} (gray), *Jak2*^{V617F} (red) and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (orange) to *Scl*-Cre animals. *** P < .001; NS, not significant; **E.** Flow cytometry measurement of bone marrow GFP⁺ (shown in green) and GFP⁻ (colors of indicates strains) CD45.2⁺ SLAM repartition in the bone marrow, 16 weeks after second transplantation in the experience shown on Figure 2D; *Scl*-Cre (n=7), *Srsf2*^{P95H} (n=6), *Jak2*^{V617F} (n=7), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=4), mean +/- SEM.**

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 3

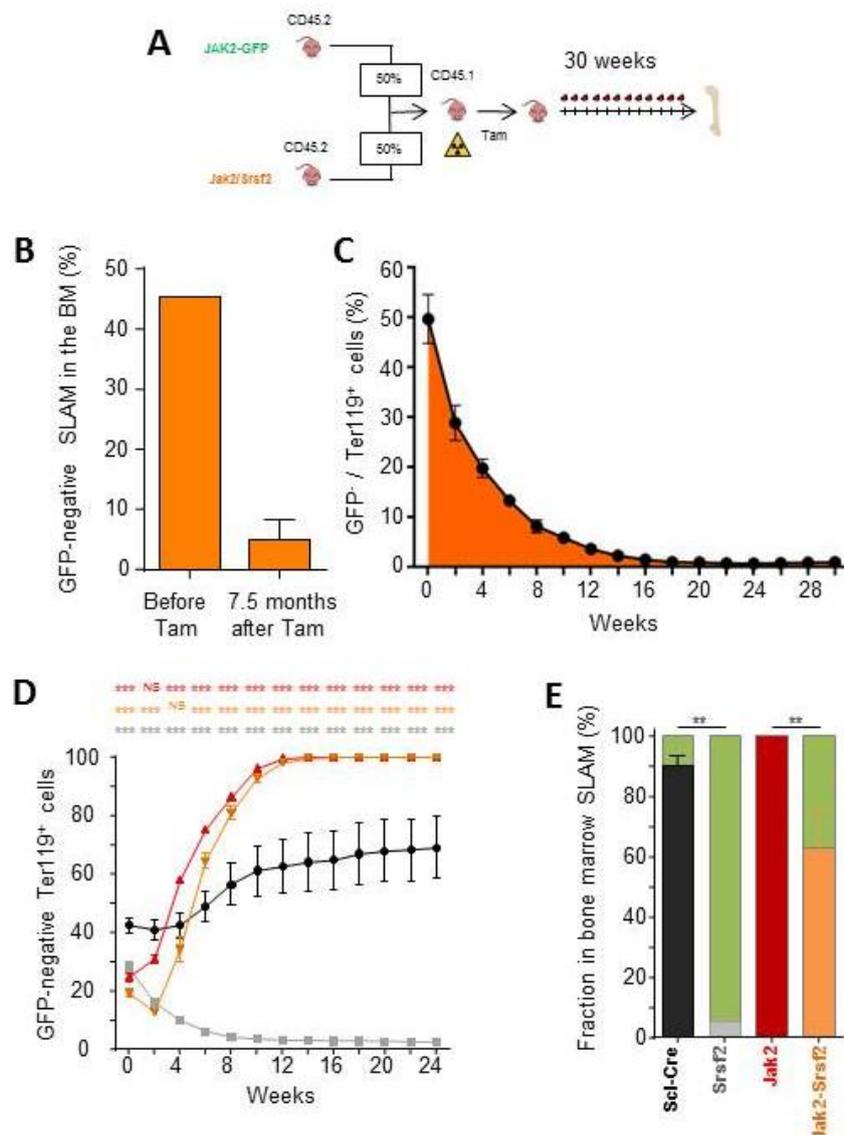
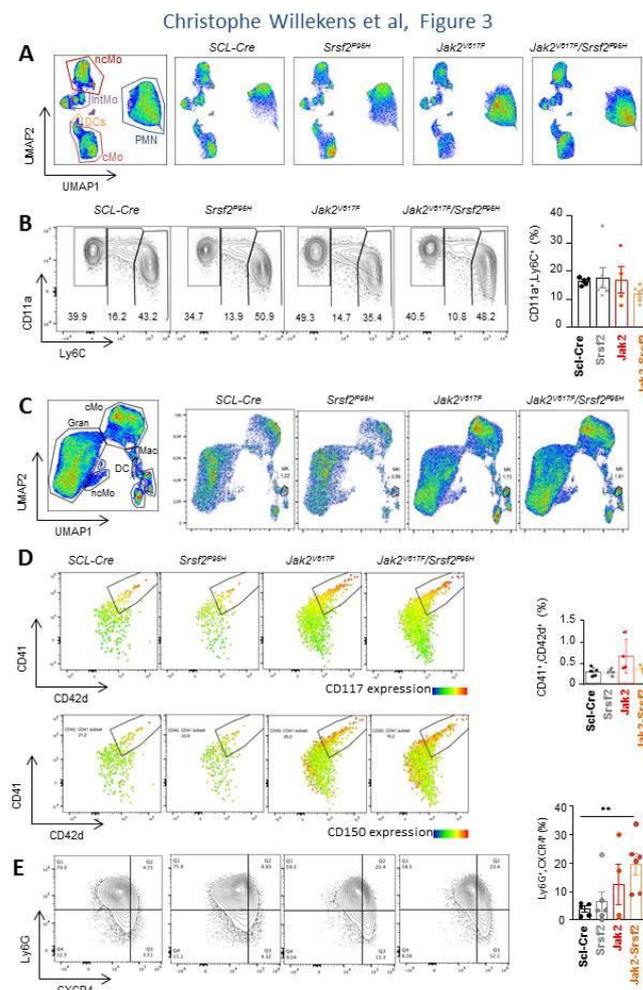
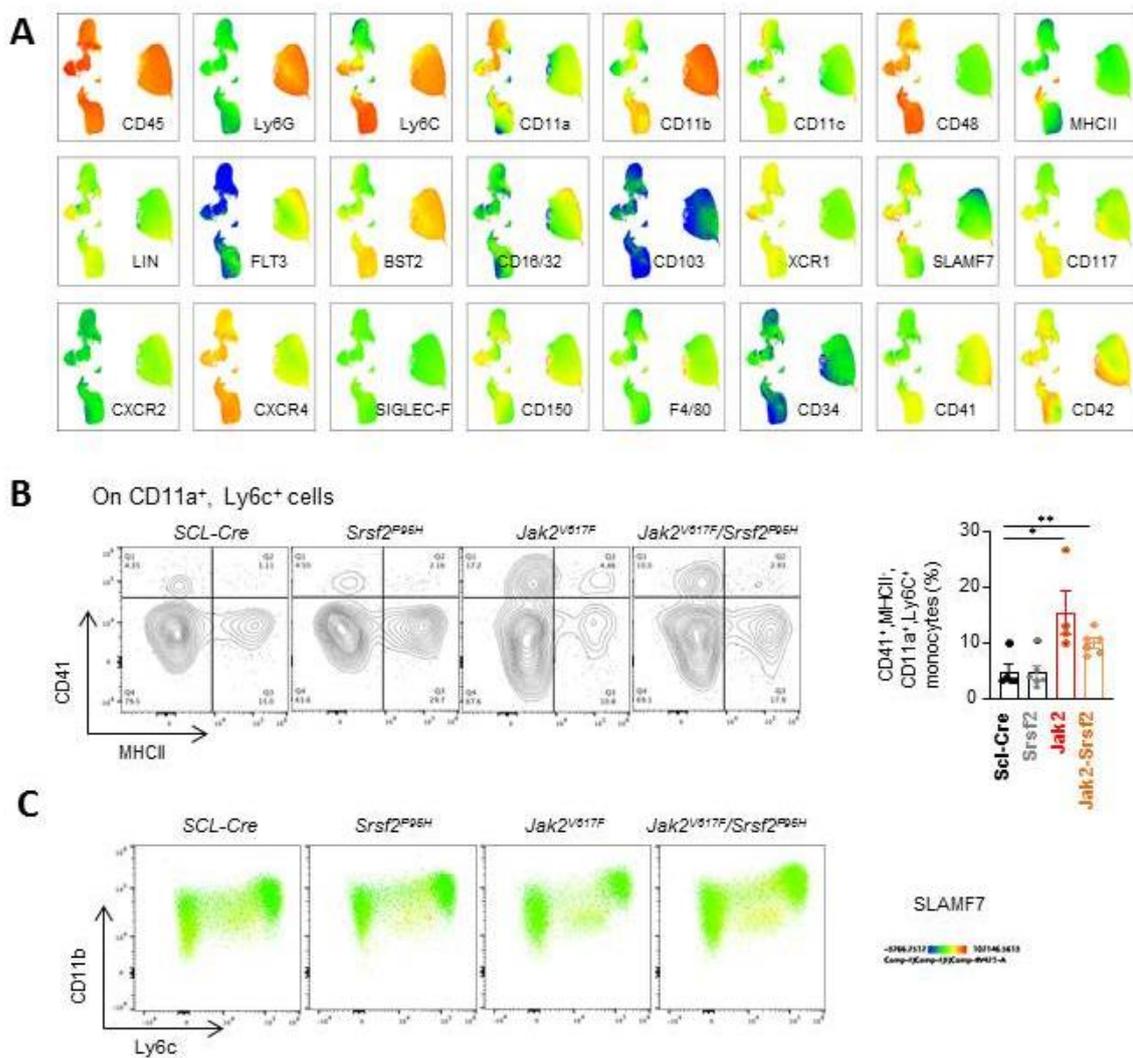


Figure 3 - Spectral flow analysis of peripheral blood and bone marrow cells. Peripheral blood and bone marrow samples collected into EDTA and subjected to red cell lysis were labelled with antibodies recognizing 30 markers and analyzed using a spectral cytometer. **A.** Non-supervised UMAP analysis of Lin⁻ (Ter119⁻, B220⁻, CD3⁻, CD56⁻) peripheral blood cells collected from *Scl-Cre* (n=6), *Srsf2^{P95H}* (n=6), *Jak2^{V617F}* (n=4) and *Jak2^{V617F} Srsf2^{P95H}* (n=6) mice. Left panel, all samples together (nc, nonclassical monocytes; cMo, classical monocytes; IntMo, intermediate monocytes; PMN, polymorphonuclear cells; DCs, dendritic cells); Right panel, pooled analysis of samples from indicated mouse strain. **B.** Partition of monocyte subsets in each mouse group (data combined from all mice in each group), based on Ly6C and CD11a expression (left panel) with individual analysis of CD11a⁺,Ly6C⁺ cell fraction among Lin⁻ cells in each mouse strain shown on the right panel; **C.** Non-supervised UMAP analysis of Ter119⁻, B220⁻, CD3⁻, CD56⁻ bone marrow blood cells collected from the same mice as in A. Left panel, all samples together (nc, nonclassical monocytes; cMo, classical monocytes; Gran, granulocytes; DC, dendritic cells; Mk, megakaryocytes; LK, Lin-Kit+ cells; CD34+ cells; Mac, macrophages); Right panel, pooled analysis of samples of indicated genotype. **D. Upper panel,** partition of megakaryocyte and their progenitors in each mouse group (data combined from all mice in each group), based on CD41 and CD42 expression, with CD150 expression level added as a third dimension according to the color panel shown on the right; **lower panel,** partition of megakaryocyte and their progenitors in each mouse group (data combined from all mice in each group), based on CD41 and CD117 expression (left panel) with individual analysis of CD41⁺,CD117⁺ immature megakaryocytes among Lin⁻ cells in each mouse strain shown on the right; **F.** Partition of granulocytes in each mouse group, based on Ly6G and CXCR4 expression (left panel) with individual analysis of Ly6G⁺,CXCR4⁺ among Ter119⁻, B220⁻, CD3⁻, CD56⁻ cells in each mouse strain shown on the right. Kruskal-Wallis test, * *P*<0.05; ** *P*<0.01; *** *P*<0.001; NS, non-significant.



Supplemental Figure 4 – Impact of *Srsf2*^{P95H} co-mutation with *Jak2*^{V617F} on peripheral blood myeloid cells. **A.** Cell surface marker expression identifying cell populations within UMAP analysis shown in Figure 3A; **B.** Partition of CD11a⁺,Ly6C⁺ monocytes according to CD41 and MHC class II expression in each mouse group (data combined from all mice in each group) (left panel); individual analysis of CD41⁺,MHC class II⁺ cell fraction among CD11a⁺,Ly6C⁺ cells in each mouse strain shown on the right; **C.** SLAMF7 expression (whose intensity is indicated on the right) on monocyte populations defined by Ly6C expression on CD11b labeled cells (data combined from all mice in each group); **D.** Partition of peripheral blood Ly6G⁺ cells according to CD16/32 and CXCR4 expression in each mouse group (data combined from all mice in each group) (left panel); individual analysis of CD16/32⁺,CXCR4⁺ cell fraction among Ly6G⁺ cells in each mouse strain shown on the right; All panels, *Scl-Cre* (n=5), *Srsf2*^{P95H} (n=5), *Jak2*^{V617F} (n=4), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=6), mean +/- SEM; unpaired t-test. * P < .05, ** P < .01.

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 4



Supplemental Figure 5 – Impact of *Srsf2*^{P95H} co-mutation with *Jak2*^{V617F} on bone marrow myeloid cells.

A. Cell surface marker expression identifying cell populations within UMAP analysis shown in Figure 3C; **B. Upper panel.** Partition of monocyte subsets in each mouse group (data combined from all mice in each group), based on Ly6C and CD11a expression (left panel) with individual analysis of CD11a⁺,Ly6C⁺ cell fraction among Lin⁻ cells in each mouse strain shown on the right; **Lower panel.** Partition of CD11a⁺,Ly6C⁺ monocytes according to CD41 and MHC class II expression on monocytes in each mouse group (data combined from all mice in each group) (left panel); individual analysis of CD41⁺,MHC class II⁺ cell fraction among CD11a⁺,Ly6C⁺ cells in the bone marrow of each mouse strain shown on the right; **C. Upper panel.** Macrophage subsets based on the expression of CD16/32 and SLAMF7 in Lin⁻ cells; left panel, data combined from all mice in each group; right panel, individual analysis of CD16/32⁺ and SLAMF7⁺ cell fraction among Lin⁻ cells in each mouse strain shown on the right; **Lower panel.** Granulo-monocyte progenitors (GMP) identified by the co-expression of CD16/32 and CD117 in bone marrow Lin⁻ cells (left panel, data combined from all mice in each strain, right, individual analysis of CD16/32⁺,CD117⁺ cell fraction among Lin⁻ cells in each mouse strain); All panels, *Scl-Cre* (n=5), *Srsf2*^{P95H} (n=5), *Jak2*^{V617F} (n=4), *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (n=6), mean +/- SEM; unpaired t-test. * P < .05, ** P < .01.

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 5

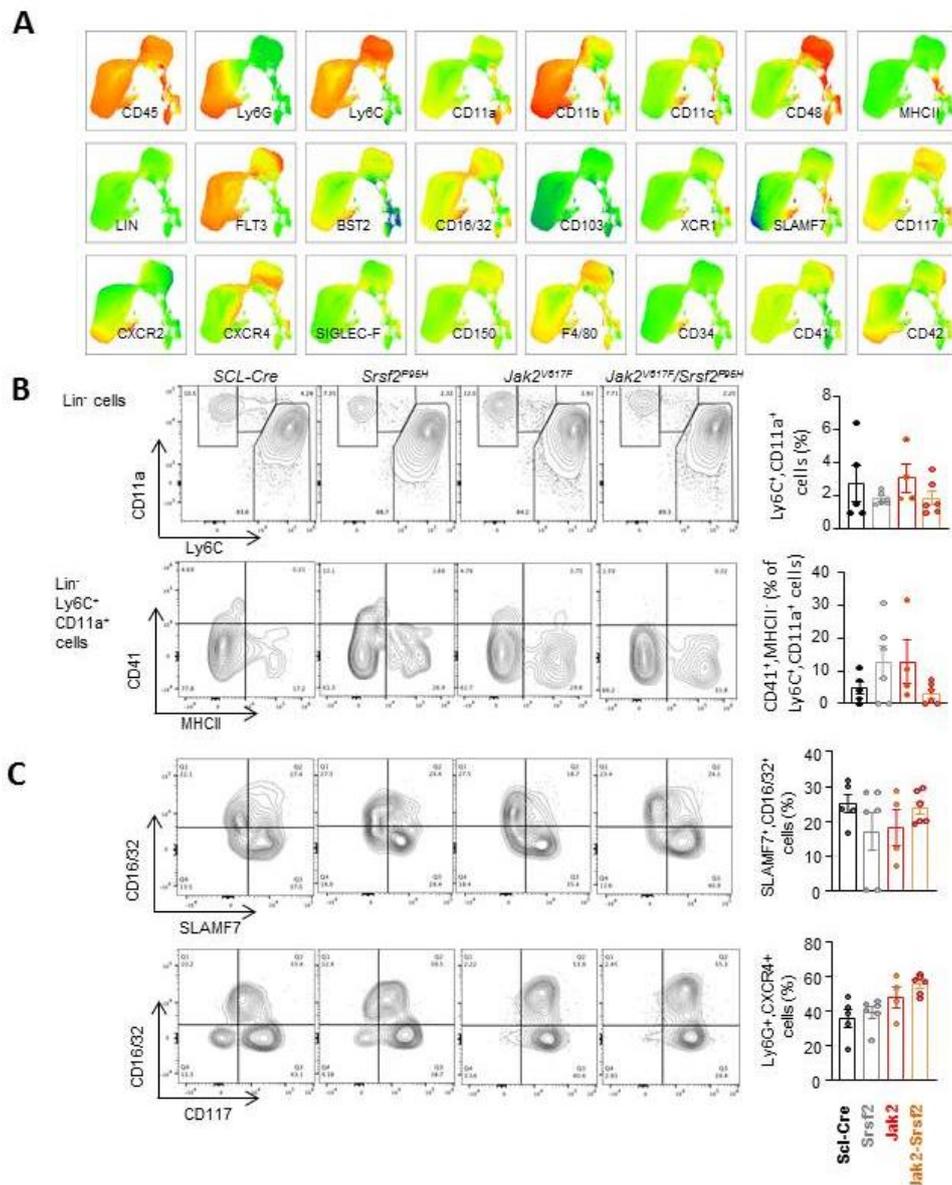
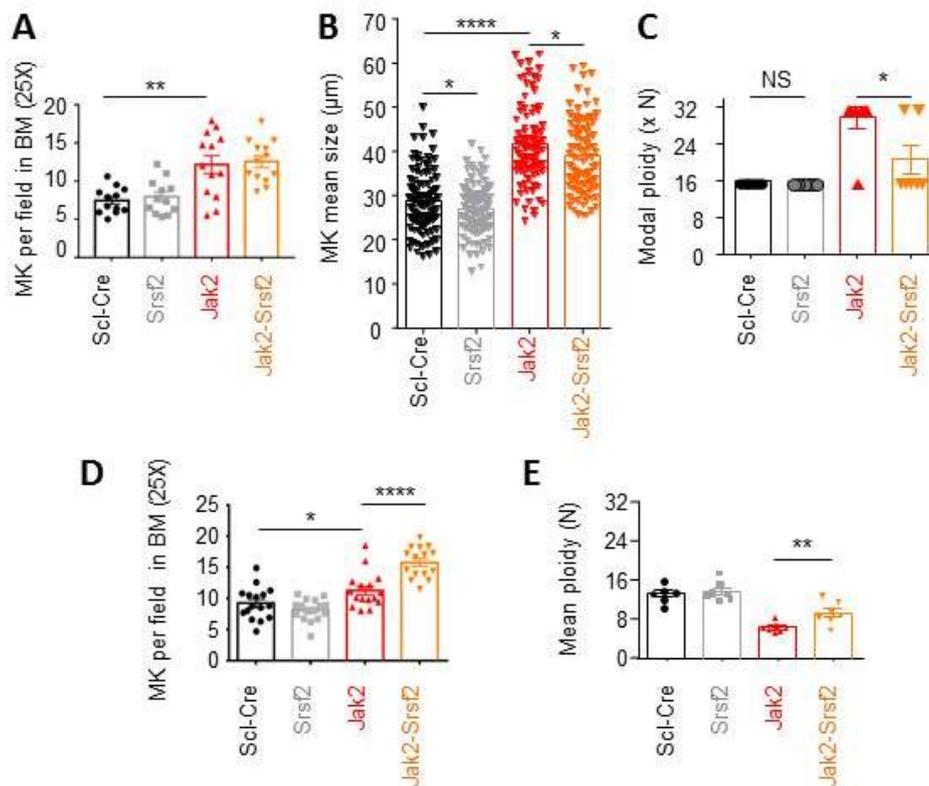


Figure 4: Impact of *Srsf2*^{P95H} on *Jak2*^{V617F}-induced megakaryocyte phenotypic modifications. A-C; Analysis of bone marrow collected 8 weeks post-tamoxifen; **A.** Number of vWF-stained megakaryocytes per field of bone marrow sections in indicated mice (mean +/- SEM); **B.** Mean size of megakaryocytes according to the genotype (mean +/- SEM); **C.** Modal ploidy measured in megakaryocytes (mean +/- SEM). **D, E.** Analysis of bone marrow collected 16-24 weeks post-tamoxifen; **D.** Number of vWF-stained megakaryocytes per field of bone marrow sections in indicated mice (mean +/- SEM); **E.** Modal ploidy measured in megakaryocytes (mean +/- SEM). Kruskal-Wallis test, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; ns, non-significant.

Christophe Willekens et al, Figure 4



Supplemental Figure 6: Impact of *Srsf2*^{P95H} on *Jak2*^{V617F}-induced megakaryocyte phenotypic modifications. **A.** Transmission electron microscopy analysis of megakaryocyte morphology in ultrathin bone marrow sections collected 8 weeks post-tamoxifen from indicated mice, two representative images are shown per genotype; magnification x XXX. **B.** Representative images of bone marrow megakaryocyte ploidy analyzed 8 weeks post tamoxifen in indicated mice; **C.** Representative image of von willebrand factor-labeled megakaryocyte on mouse bone marrow sections of indicated genotypes; magnification x25. **D.** Bone marrow megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP, LK, CD34⁻, CD16/32⁻) and megakaryocyte progenitors (MKP, LK, CD41⁺, CD150⁺) fraction in bone marrow collected 24 weeks post-tamoxifen from indicated mice. Mean +/- SEM; **E.** Mean distance between vwf+ cells and endosteum (μm) in each individual animal, classified as indicated. Mean +/- SEM.

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 6

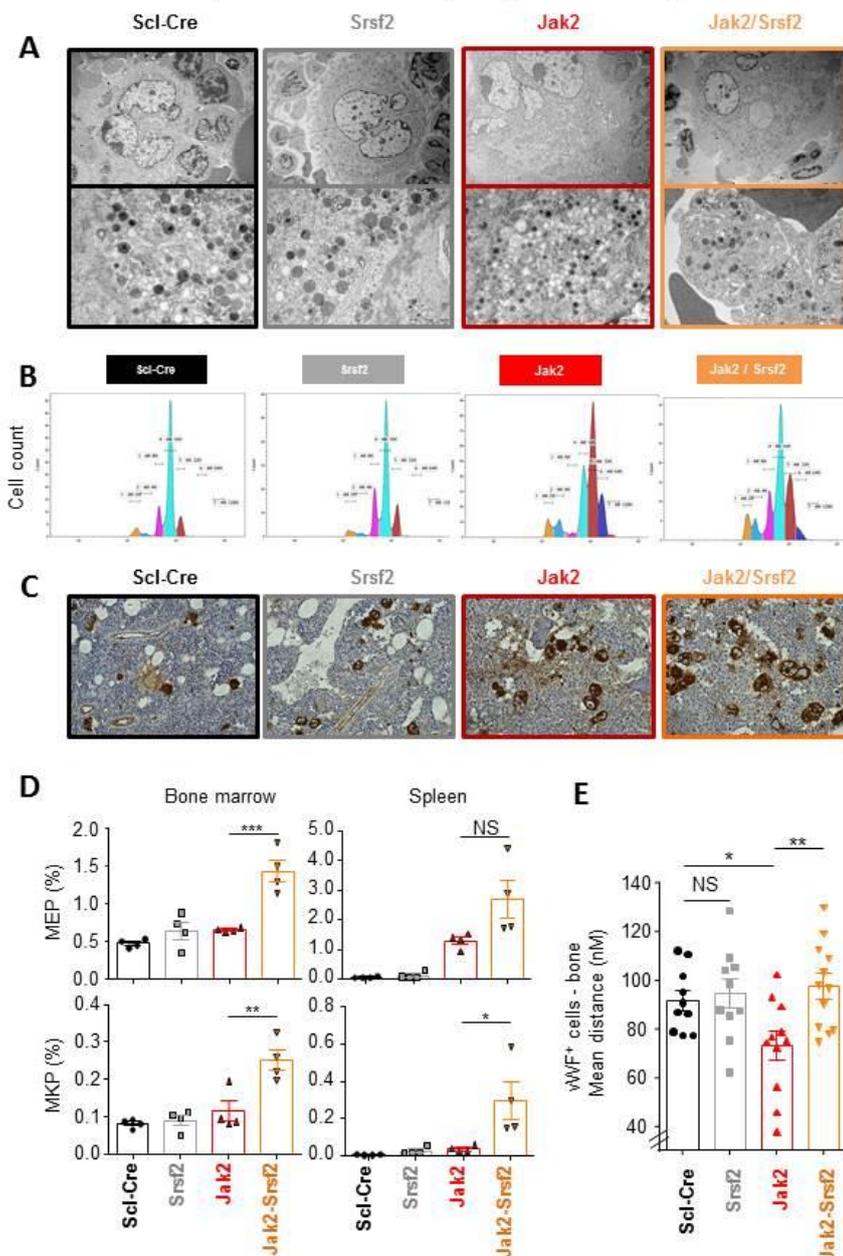
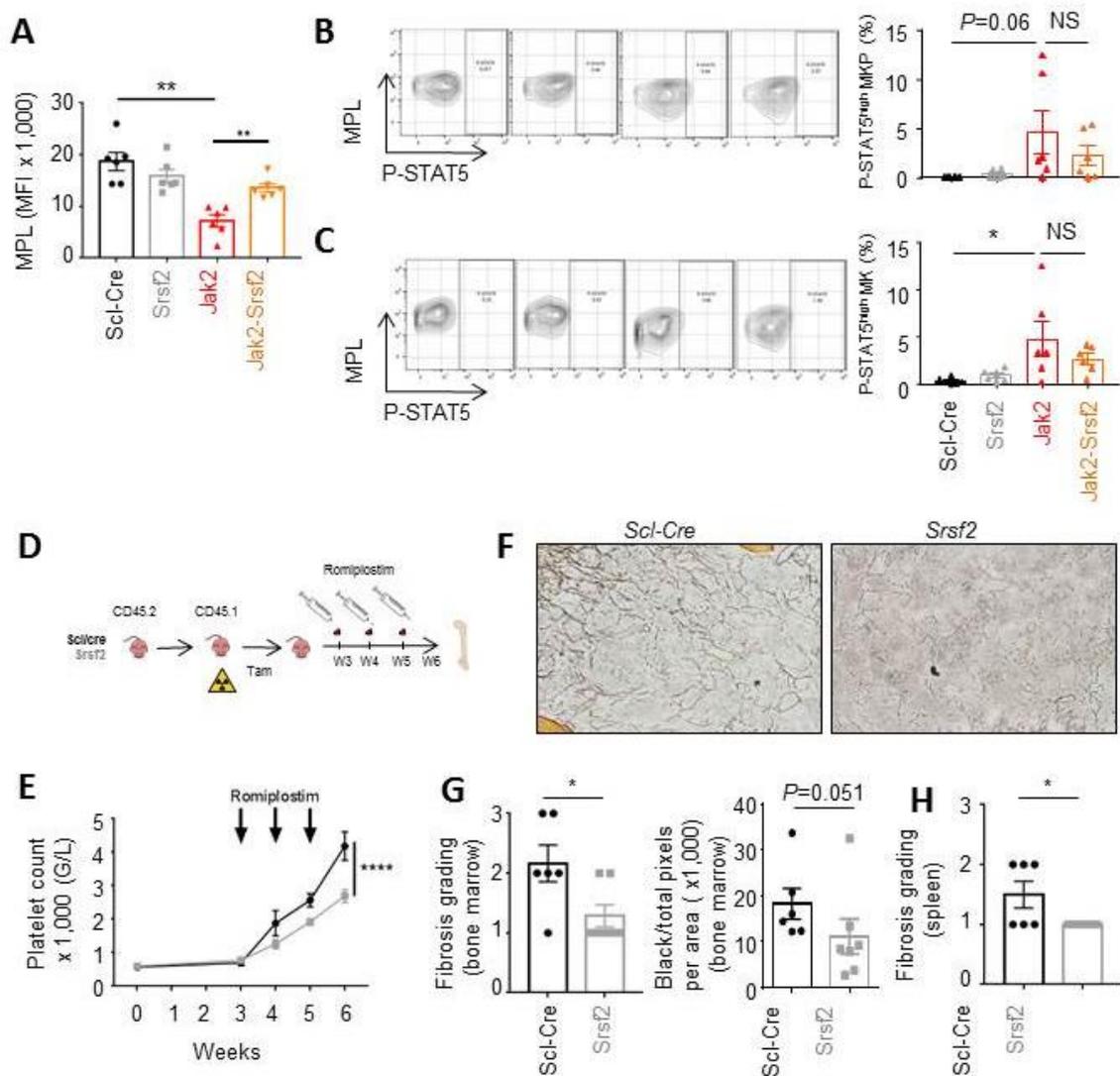


Figure 5: *Srsf2*^{P95H} interferes with JAK/STAT signaling. **A.** Flow cytometry analysis of MPL surface expression (mean +/- SEM) on CD41⁺ and CD42d⁺ cells of indicated mice; **B,C.** Mass cytometry analysis of MPL expression and P-STAT5 intensity in bone marrow MK progenitors (B) and MKs (C); left panel, samples pooled by genotype, right panel individual measurements; **D-H,** Romiplostim-induced myelofibrosis; **D.** Mice engrafted with 3 x 10⁶ *Scl-Cre* or *Srsf2*^{P95H} bone marrow cells were treated with tamoxifen as in Figure 1A. Three weeks later, they received subcutaneous injections of romiplostim (1 mg/kg) every week for 3 weeks, while peripheral blood was collected for blood cell count. Animals were sacrificed at day 21. **E.** Evolution of platelet count in *Scl-Cre* or *Srsf2*^{P95H} transplanted animals upon romiplostim treatment; **F.** Bone marrow section of *Scl-Cre* or *Srsf2*^{P95H} transplanted animals at day 21; **G.** Myelofibrosis in romiplostim-treated, *Scl-Cre* or *Srsf2*^{P95H} transplanted mice at day 21, evaluated by either grading (left panel) or image J (right panel); **H.** spleen fibrosis was evaluated by grading in the same animals. Kruskal-Wallis test, * P<0.05; ** P<0.01; NS, non-significant.

Christophe Willekens et al, Figure 5



Supplemental Figure 7. A. Expression of markers used to identify cell populations within UMAP analysis shown in panel B; **B.** UMAP of Lin⁻ bone marrow cells (all the samples pooled together). **C.** Impact of genotype on bone marrow cell subsets in the UMAP shown in B (upper panel) and individual samples (lower panels). **D.** UMAP of megakaryocytic progenitors in each genotype (pooled samples). **E.** Expression of indicated markers on UMPA shown in D according to the genotype (pooled samples per genotype). **F.** UMAP of megakaryocytes in each genotype (pooled samples per genotype). **G.** Expression of indicated markers on UMPA shown in F according to the genotype (pooled samples per genotype)

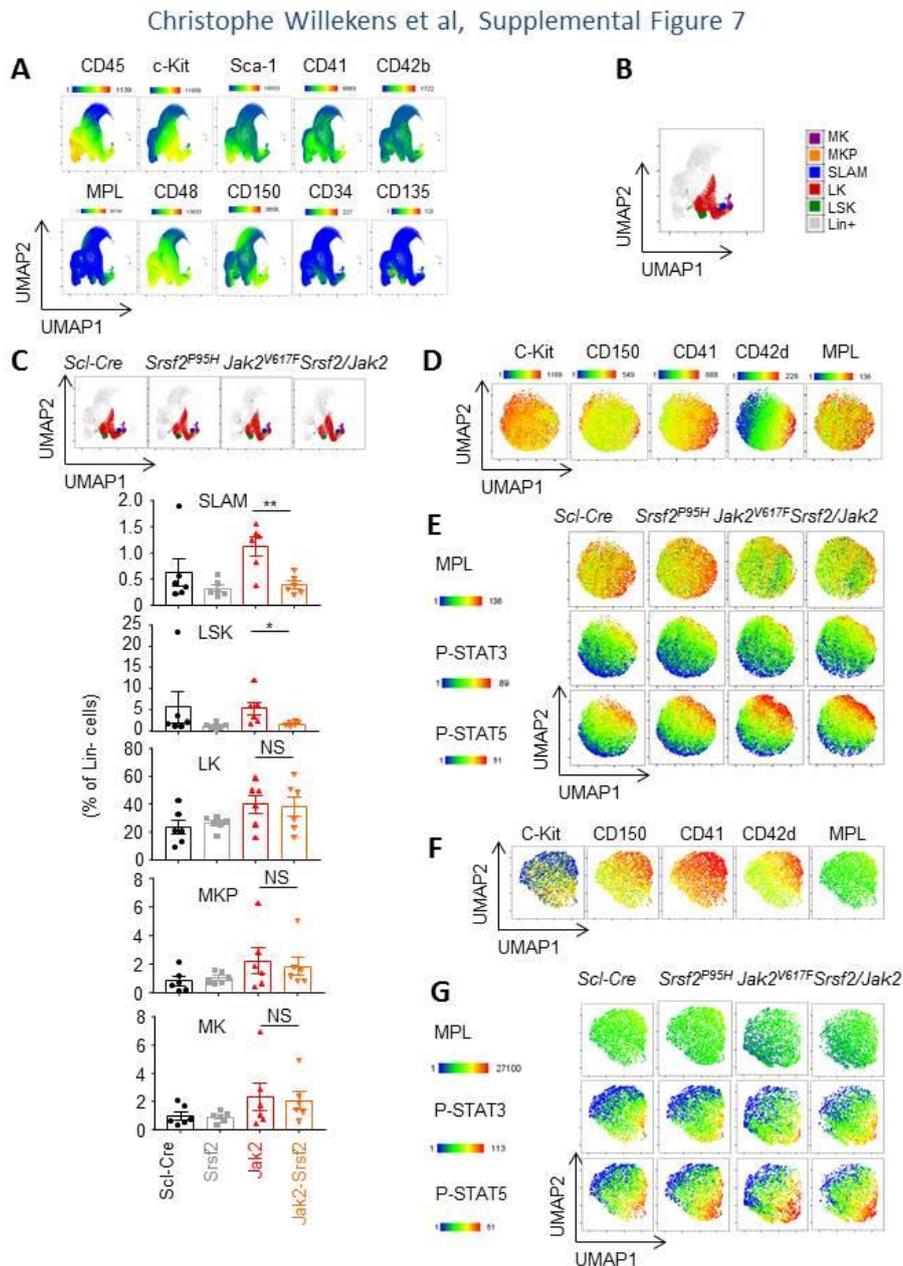
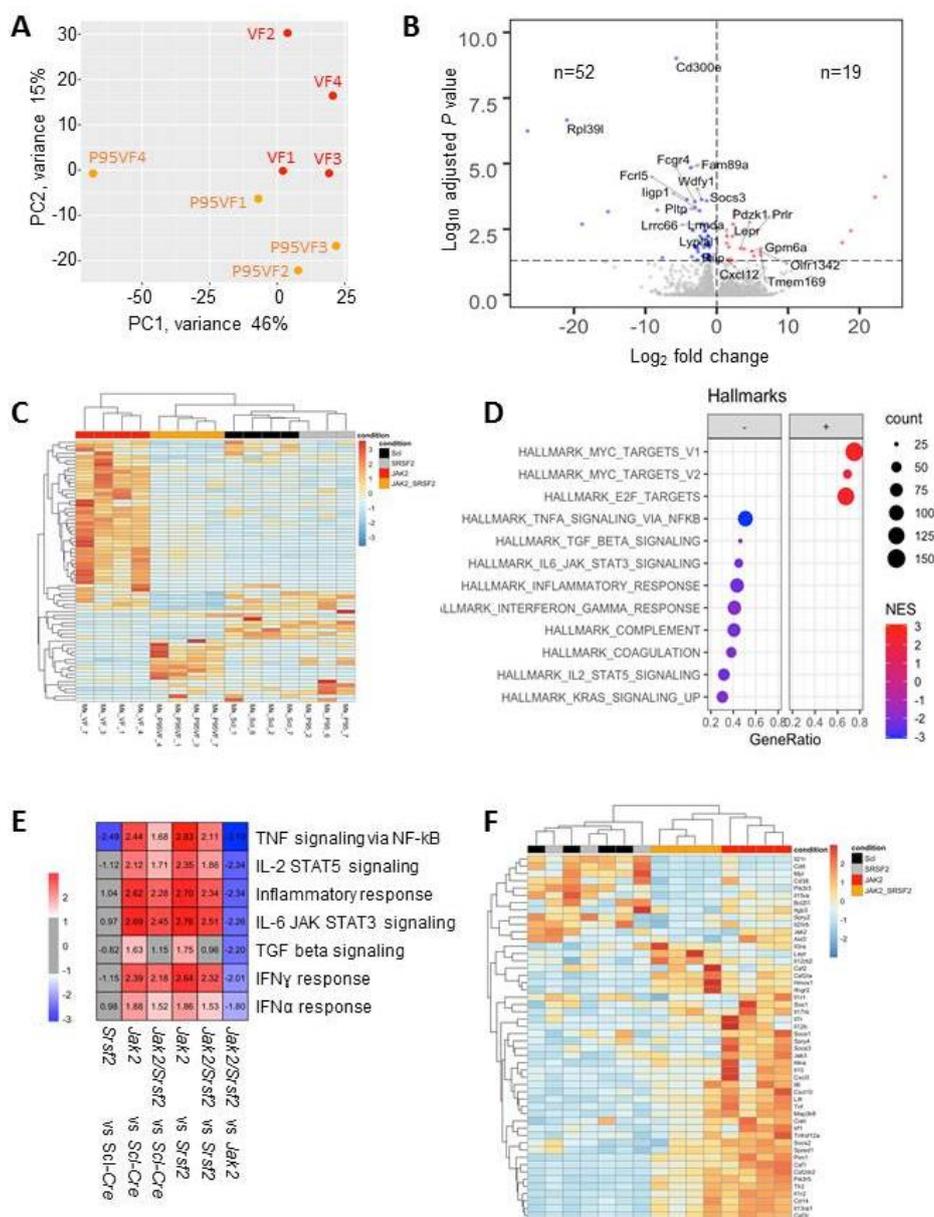


Figure 6. *Srsf2*^{P95H} co-mutation with *Jak2*^{V617F} down-regulates genes involved in signaling pathways. Megakaryocytes sorted from mouse bone marrow engrafted as in Figure 1A and sacrificed 8 weeks post tamoxifen were analyzed by bulk RNA sequencing. **A.** Principal component analysis (PCA) of *Jak2*^{V617F} (red, VF) and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (orange, P95VF) mouse megakaryocytes; **B.** Volcanoplot analysis of differentially expressed genes (DEGs) between *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} megakaryocytes, numbers indicate down-regulated (n=52) and up-regulated (n=19) genes in *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} cells; **C.** Heatmap of the expression of the 71 DEG between *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} megakaryocytes in all mice, with unsupervised hierarchical clustering **D.** Pathway analysis of the comparison between *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} megakaryocytes, using gene set enrichment analysis (GSEA); **E.** Enrichment score of signaling pathways among mouse models (up-regulated in red, down-regulated in blue, not significantly modified in grey); **F.** Heatmap of the 50 most-significant DEGs of the hallmark IL6_JAK_STAT3_SIGNALING between *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} megakaryocytes.

Christophe Willekens et al, Figure 6



Supplemental Figure 8. Differentially expressed genes in mouse model megakaryocytes. Megakaryocytes were sorted from mouse bone marrow engrafted as in Figure 1A and sacrificed 8 weeks post tamoxifen, and analyzed by RNA sequencing. **A.** Sample distance analysis of the studied megakaryocyte populations, after regularized log transformation; **B.** Principal component analysis (PCA) of *Scl-Cre* (black), *Srsf2*^{P95H} (grey), *Jak2*^{V617F} (red) and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (orange) mouse megakaryocytes based on the 500 most variable genes; **C.** Upset plot quantifying the results of our 6 pairwise differential analyses and the intersection between differentially expressed genes (DEGs). Set Size indicates the total number of DEGs for each differential analysis, intersection size indicates the number of DEGs that are common between differential analysis indicated by highlighted dots.; **D.** Volcanoplots representing the results of differential analyses comparing *Srsf2*^{P95H} (left), *Jak2*^{V617F} (middle) and *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} (right) megakaryocytes to *Scl-Cre* megakaryocytes, respectively; numbers indicate the number of down-regulated (blue) and up-regulated (red) genes genetically modified cells, genes not differentially expressed are in grey with a cutoff of $\text{padj} < 0.05$; **E.** Cnet plot of the signaling pathways identified through the GSEA analysis *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} versus *Jak2*^{V617F} megakaryocyte showing the overlaps between these pathways. Color of the dots indicate the degree of downregulation. Colored lines regroup genes by pathways.

Supplemental Figure 9. RNA sequencing of bone marrow Lin⁻negative cells. Analyses of lineage associated genes among differentially expressed genes, separating up- and down-regulated genes, between *Jak2*^{V617F} or *Srsf2*^{P95H} or *Jak2*^{V617F}/*Srsf2*^{P95H} and Scl-Cre bone marrow Lin⁻ cells collected 3 weeks after tamoxifen breeding in transplanted animals. The analysis was performed using CellRadar software (<https://karlssong.github.io/cellradar/>) which compares gene sets to lineage-associated genes from BloodSpot database.

Christophe Willekens et al, Supplemental Figure 9

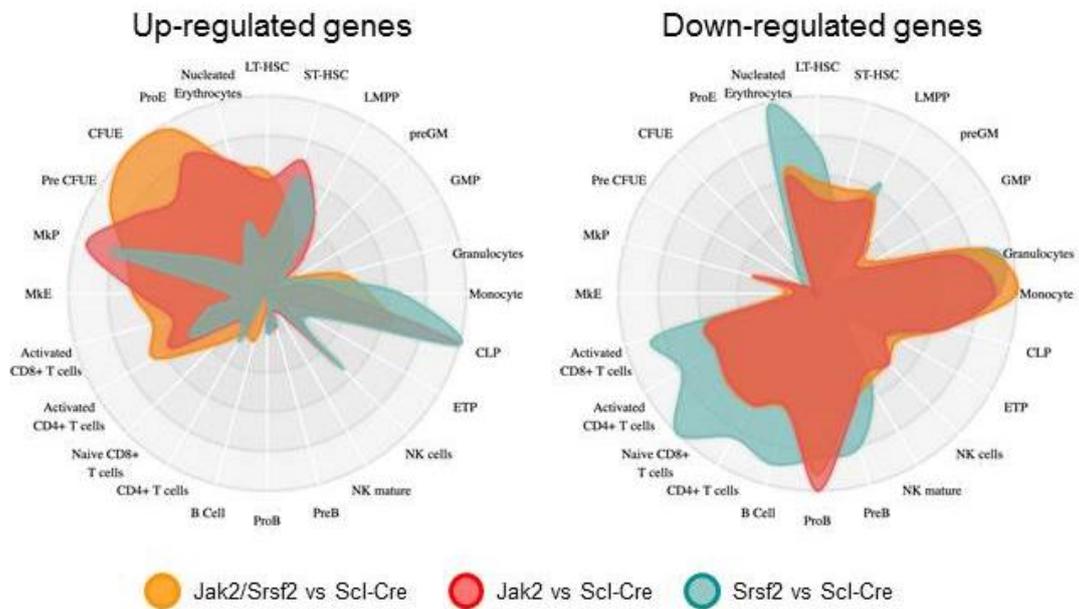
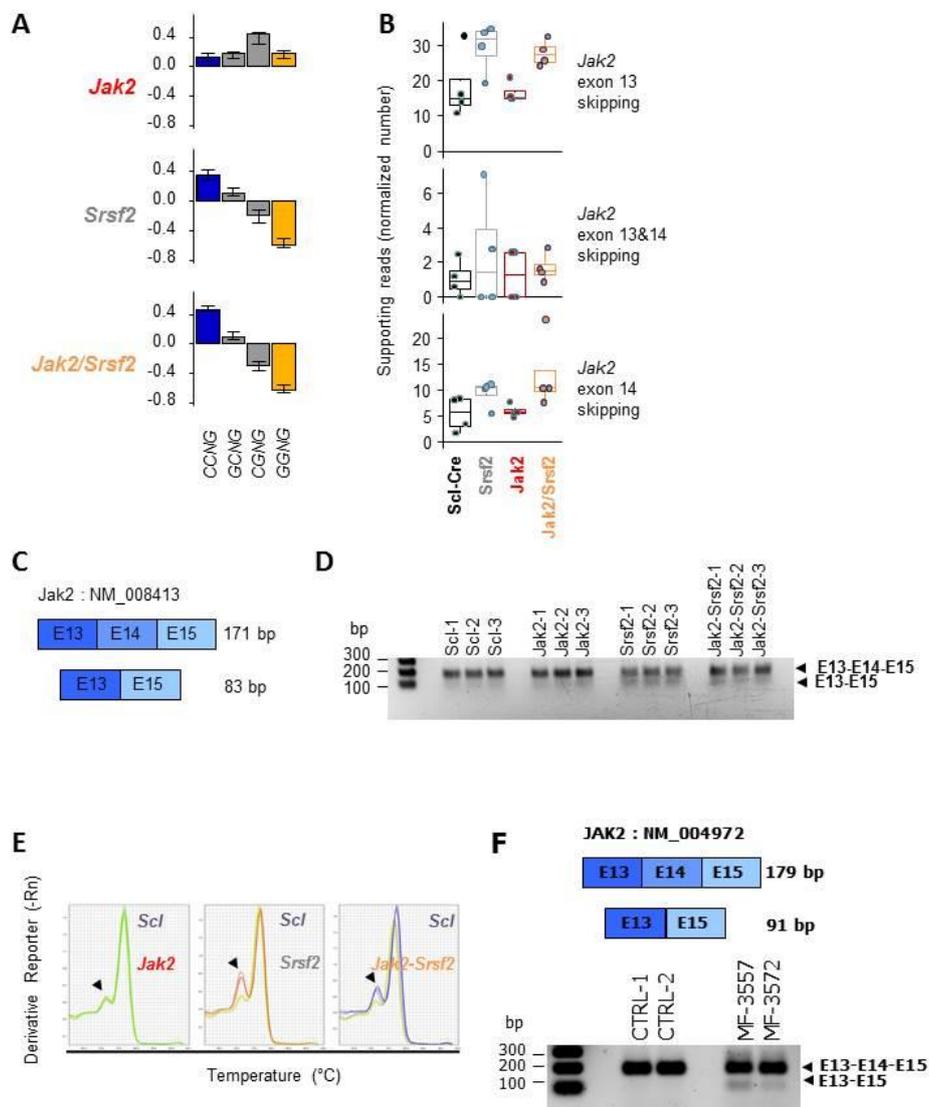


Figure 7. *Srsf2*^{P95H} affects *Jak2* exon 5 splicing. **A.** Relative enrichment of all four SNG variants, where S represents C or G, in cassette exons that are differentially spliced upon expression of mutant *Srsf2*^{P95H}, in the context of wild-type or mutated *Jak2*. **B.** Analysis of RNA sequencing data shown on figure 6, suggesting more skipping of *Jak2* exon 13 and exon 14 in *Srsf2* mutated cells. **C.** RT-qPCR analysis of *Jak2* exon 14 skipping using primers that generate a 171 bp (exon 14 included) and an 83 bp (exon 14 excluded) cDNA fragments in mouse samples. **D.** Agarose gel showing an increased 83 bp fragment in *Srsf2* mutated megakaryocytes; **E.** RT-qPCR dissociation curve showing the 2 amplicons: higher peak, 171 bp (exon 14 included); lower peak, 83 bp (exon 14 excluded). **F.** RT-qPCR analysis of *Jak2* exon 14 skipping using primers that generate a 179 bp (exon 14 included) and a 91 bp (exon 14 excluded) cDNA fragments in the granulocytes of two MF patients with *Jak2*V617F/*Srsf2*P95H double mutants (MF) and two healthy volunteers (CTRL).

Christophe Willekens et al, Figure 7



References

1. Austin RJ, Straube J, Bruedigam C, Pali G, Jacquelin S, Vu T, Green J, Gräsel J, Lansink L, Cooper L, Lee SJ, Chen NT, Lee CW, Haque A, Heidel FH, D'Andrea R, Hill GR, Mullally A, Milsom MD, Bywater M, Lane SW. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm hematopoietic stem cell populations. *Leukemia*. 2020 Apr;34(4):1075-1089. doi: 10.1038/s41375-019-0638-y. Epub 2019 Nov 15.
2. Bartels S, Faisal M, Büsche G, Schlue J, Hasemeier B, Schipper E, Vogtmann J, Westphal L, Lehmann U, Kreipe H. Mutations associated with age-related clonal hematopoiesis in PMF patients with rapid progression to myelofibrosis. *Leukemia*. 2020 May;34(5):1364-1372. doi: 10.1038/s41375-019-0668-5. Epub 2019 Nov 27.
3. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*. 2003 Apr 15;101(8):2940-54. doi: 10.1182/blood-2002-04-1204. Epub 2002 Dec 12.
4. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood*. 1981 Apr;57(4):781-7.
5. Catarsi P, Rosti V, Morreale G, Poletto V, Villani L, Bertorelli R, Pedrazzini M, Zorzetto M, Barosi G; AGIMM investigators. JAK2 exon 14 skipping in patients with primary myelofibrosis: a minor splice variant modulated by the JAK2-V617F allele burden. *PLoS One*. 2015 Jan 24;10(1):e0116636. doi: 10.1371/journal.pone.0116636. eCollection 2015.
6. Chen L, Chen JY, Huang YJ, Gu Y, Qiu J, Qian H, Shao C, Zhang X, Hu J, Li H, He S, Zhou Y, Abdel-Wahab O, Zhang DE, Fu XD. The Augmented R-Loop Is a Unifying Mechanism for Myelodysplastic Syndromes Induced by High-Risk Splicing Factor Mutations. *Mol Cell*. 2018 Feb 1;69(3):412-425.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.029.
7. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, Bruno E, Barosi G, Xu M, Hoffman R. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):986-93. doi: 10.1182/blood-2006-12-064626. Epub 2007 May 1.
8. Courtier F, Garnier S, Carbuccia N, Guille A, Adélaïde J, Chaffanet M, Hirsch P, Paz DL, Slama B, Vey N, Ugo V, Delhommeau F, Rey J, Birnbaum D, Murati A. Targeted molecular characterization shows differences between primary and secondary myelofibrosis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Jul 24. doi: 10.1002/gcc.22789.
9. Dagher T, Maslah N, Edmond V, Cassinat B, Vainchenker W, Giraudier S, Pasquier F, Verger E, Niwa-Kawakita M, Lallemand-Breitenbach V, Plo I, Kiladjian JJ, Villeval JL, de Thé H. JAK2V617F myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML. *J Exp Med*. 2021 Feb 1;218(2):e20201268. doi: 10.1084/jem.20201268.
10. Decker M, Martinez-Morentin L, Wang G, Lee Y, Liu Q, Leslie J, Ding L. Leptin-receptor-expressing bone marrow stromal cells are myofibroblasts in primary myelofibrosis. *Nat Cell Biol*. 2017 Jun;19(6):677-688. doi: 10.1038/ncb3530. Epub 2017 May 8.
11. Desterke C, Bilhou-Nabéra C, Guerton B, Martinaud C, Tonetti C, Clay D, Guglielmelli P, Vannucchi A, Bordessoule D, Hasselbalch H, Dupriez B, Benzoubir N, Bourgeade MF, Pierre-Louis O, Lazar V, Vainchenker W, Bennaceur-Griscelli A, Gisslinger H, Giraudier S, Le Bousse-Kerdilès MC; French Intergroup of Myeloproliferative Disorders; French INSERM; European EUMNET Networks on Myelofibrosis. FLT3-mediated p38-MAPK activation participates in the control of megakaryopoiesis in primary myelofibrosis. *Cancer Res*. 2011 Apr 15;71(8):2901-15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1731. Epub 2011 Apr 12. PMID: 21487043
12. Di Buduo CA, Giannini S, Abbonante V, Rosti V, Hoffmeister KM, Balduini A. Increased B4GALT1 expression is associated with platelet surface galactosylation and thrombopoietin plasma levels in MPNs. *Blood*. 2021 Apr 15;137(15):2085-2089. doi: 10.1182/blood.2020007265.
13. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA, Bagnato S, Stagno F, Giustolisi GM, Cacciola E, Sortino G, Guglielmo P, Giustolisi R. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia*. 2001 Jun;15(6):976-80. doi: 10.1038/sj.leu.2402124.

14. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, Bellusci S. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell*. 2017 Aug 3;21(2):166-177.
15. Eliades A, Papadantonakis N, Bhupatiraju A, BurrIDGE KA, Johnston-Cox HA, Migliaccio AR, Crispino JD, Lucero HA, Trackman PC, Ravid K. Control of megakaryocyte expansion and bone marrow fibrosis by lysyl oxidase. *J Biol Chem*. 2011 Aug 5;286(31):27630-8. doi: 10.1074/jbc.M111.243113. Epub 2011 Jun 10.
16. Fava RA, Casey TT, Wilcox J, Pelton RW, Moses HL, Nanney LB. Synthesis of transforming growth factor-beta 1 by megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet alpha-granules. *Blood*. 1990 Nov 15;76(10):1946-55.
17. Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, Hardaway B, Abramowicz S, Xiao T, Liu W, Thomas DG, Hajebrahimi MA, Pircher J, Silvestre-Roig C, Kotini AG, Luchsinger LL, Wei Y, Westerterp M, Snoeck HW, Papapetrou EP, Schulz C, Massberg S, Soehnlein O, Ebert B, Levine RL, Reilly MP, Libby P, Wang N, Tall AR. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature*. 2021 Apr;592(7853):296-301. doi: 10.1038/s41586-021-03341-5. Epub 2021 Mar 17.
18. Fisher DAC, Miner CA, Engle EK, Hu H, Collins TB, Zhou A, Allen MJ, Malkova ON, Oh ST. Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NFkappaB signaling. *Leukemia*. 2019 Aug;33(8):1978-1995. doi: 10.1038/s41375-019-0379-y.
19. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S, Vasudevan KB, LaTocha DH, Yang F, Press RD, Loriaux MM, Pahl HL, Silver RT, Agarwal A, O'Hare T, Druker BJ, Bagby GC, Deininger MW. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6392-8. doi: 10.1182/blood-2011-04-348144. Epub 2011 Aug 22.
20. Frangogiannis N. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis. *J Exp Med*. 2020 Feb 13;217(3):e20190103. doi: 10.1084/jem.20190103. Print 2020 Mar 2.
21. Gangat N, Marinaccio C, Swords R, Watts JM, Gurbuxani S, Rademaker A, Fought AJ, Frankfurt O, Altman JK, Wen QJ, Farnoud N, Famulare CA, Patel A, Tapia R, Vallapureddy RR, Barath S, Graf A, Handlogten A, Zblewski D, Patnaik MM, Al-Kali A, Dinh YT, Englund Prahla K, Patel S, Nobrega JC, Tejera D, Thomassen A, Gao J, Ji P, Rampal RK, Giles FJ, Tefferi A, Stein B, Crispino JD. Aurora Kinase A Inhibition Provides Clinical Benefit, Normalizes Megakaryocytes, and Reduces Bone Marrow Fibrosis in Patients with Myelofibrosis: A Phase I Trial. *Clin Cancer Res*. 2019 Aug 15;25(16):4898-4906. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-1005. Epub 2019 May 6.
22. Gangat N, Tefferi A. Myelofibrosis biology and contemporary management. *Br J Haematol*. 2020 Mar 20. doi: 10.1111/bjh.16576.
23. Gersuk GM, Carmel R, Pattengale PK. Platelet-derived growth factor concentrations in platelet-poor plasma and urine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1989 Nov 15;74(7):2330-4.
24. Gibbons MA, MacKinnon AC, Ramachandran P, Dhaliwal K, Duffin R, Phythian-Adams AT, van Rooijen N, Haslett C, Howie SE, Simpson AJ, Hirani N, Gaudie J, Iredale JP, Sethi T, Forbes SJ. Ly6Chi monocytes direct alternatively activated profibrotic macrophage regulation of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Sep 1;184(5):569-81. doi: 10.1164/rccm.201010-1719OC.
25. Gilles L, Arslan AD, Marinaccio C, Wen QJ, Arya P, McNulty M, Yang Q, Zhao JC, Konstantinoff K, Lasho T, Pardanani A, Stein B, Plo I, Sundaravel S, Wickrema A, Migliaccio A, Gurbuxani S, Vainchenker W, Plataniias LC, Tefferi A, Crispino JD. Downregulation of GATA1 drives impaired hematopoiesis in primary myelofibrosis. *J Clin Invest*. 2017 Apr 3;127(4):1316-1320. doi: 10.1172/JCI82905. Epub 2017 Feb 27.
26. Gleitz HFE, Dugourd AJF, Leimkühler NB, Snoeren IAM, Fuchs SNR, Menzel S, Ziegler S, Kröger N, Trivai I, Büsche G, Kreipe H, Banjanin B, Pritchard JE, Hoogenboezem R, Bindels EM, Schumacher N, Rose-John S, Elf S, Saez-Rodriguez J, Kramann R, Schneider RK. Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood*. 2020 Oct 29;136(18):2051-2064. doi: 10.1182/blood.2019004095.
27. Göthert JR, Gustin SE, Hall MA, Green AR, Göttgens B, Izon DJ, Begley CG. In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2724-32. doi: 10.1182/blood-2004-08-3037.

28. Grimwade LF, Happerfield L, Tristram C, McIntosh G, Rees M, Bench AJ, Boyd EM, Hall M, Quinn A, Piggott N, Scorer P, Scott MA, Erber WN. Phospho-STAT5 and phospho-Akt expression in chronic myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol.* 2009 Nov;147(4):495-506. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07870.x. Epub 2009 Aug 31.
29. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, Godfrey AL, Papaemmanuil E, Gundem G, MacLean C, Cook J, O'Neil L, O'Meara S, Teague JW, Butler AP, Massie CE, Williams N, Nice FL, Andersen CL, Hasselbalch HC, Guglielmelli P, McMullin MF, Vannucchi AM, Harrison CN, Gerstung M, Green AR, Campbell PJ. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2018 Oct 11;379(15):1416-1430. doi: 10.1056/NEJMoa1716614.
30. Grisouard J, Li S, Kubovcakova L, Rao TN, Meyer SC, Lundberg P, Hao-Shen H, Romanet V, Murakami M, Radimerski T, Dirnhofer S, Skoda RC. JAK2 exon 12 mutant mice display isolated erythrocytosis and changes in iron metabolism favoring increased erythropoiesis. *Blood.* 2016 Aug 11;128(6):839-51. doi: 10.1182/blood-2015-12-689216. Epub 2016 Jun 10.
31. Hasan S, Lacout C, Marty C, Cuingnet M, Solary E, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood.* 2013 Aug 22;122(8):1464-77. doi: 10.1182/blood-2013-04-498956.
32. Huang Z, Richmond TD, Muntean AG, Barber DL, Weiss MJ, Crispino JD. STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *J Clin Invest.* 2007 Dec;117(12):3890-9. doi: 10.1172/JCI33010.
33. Ianotto JC, Chauveau A, Boyer-Perrard F, Gyan E, Laribi K, Cony-Makhoul P, Demory JL, de Renzis B, Dosquet C, Rey J, Roy L, Dupriez B, Knoops L, Legros L, Malou M, Hutin P, Ranta D, Benbrahim O, Ugo V, Lippert E, Kiladjian JJ. Benefits and pitfalls of pegylated interferon-alpha2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica.* 2018 Mar;103(3):438-446. doi: 10.3324/haematol.2017.181297. Epub 2017 Dec 7.
34. Jacquelin S, Straube J, Cooper L, Vu T, Song A, Bywater M, Baxter E, Heidecker M, Wackrow B, Porter A, Ling V, Green J, Austin R, Kazakoff S, Waddell N, Hesson LB, Pimanda JE, Stegelmann F, Bullinger L, Döhner K, Rampal RK, Heckl D, Hill GR, Lane SW. Jak2V617F and Dnmt3a loss cooperate to induce myelofibrosis through activated enhancer-driven inflammation. *Blood.* 2018 Dec 27;132(26):2707-2721. doi: 10.1182/blood-2018-04-846220.
35. Jayavelu AK, Schnöder TM, Perner F, Herzog C, Meiler A, Krishnamoorthy G, Huber N, Mohr J, Edelmann-Stephan B, Austin R, Brandt S, Palandri F, Schröder N, Isermann B, Edlich F, Sinha AU, Ungelenk M, Hübner CA, Zeiser R, Rahmig S, Waskow C, Coldham I, Ernst T, Hochhaus A, Jilg S, Jost PJ, Mullally A, Bullinger L, Mertens PR, Lane SW, Mann M, Heide FH. Splicing factor YBX1 mediates persistence of JAK2-mutated neoplasms. *Nature.* 2020 Dec;588(7836):157-163. doi: 10.1038/s41586-020-2968-3. Epub 2020 Nov 25.
36. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC, Ramakrishnan A, Li Y, Chung YR, Micol JB, Murphy ME, Cho H, Kim MK, Zebari AS, Aumann S, Park CY, Buonamici S, Smith PG, Deeg HJ, Lobry C, Aifantis I, Modis Y, Allain FH, Halene S, Bradley RK, Abdel-Wahab O. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell.* 2015 May 11;27(5):617-30. doi: 10.1016/j.ccell.2015.04.006.
37. Kirito K, Osawa M, Morita H, Shimizu R, Yamamoto M, Oda A, Fujita H, Tanaka M, Nakajima K, Miura Y, Ozawa K, Komatsu N. A functional role of Stat3 in in vivo megakaryopoiesis. *Blood.* 2002 May 1;99(9):3220-7. doi: 10.1182/blood.v99.9.3220.
38. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, Riester M, Keller M, Bastian L, Hricik T, Bhagwat N, McKenney AS, Papalexis E, Abdel-Wahab O, Rampal R, Marubayashi S, Chen JJ, Romanet V, Fridman JS, Bromberg J, Teruya-Feldstein J, Murakami M, Radimerski T, Michor F, Fan R, Levine RL. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov.* 2015 Mar;5(3):316-31. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0736. Epub 2015 Jan 8.
39. Kon A, Yamazaki S, Nannya Y, Kataoka K, Ota Y, Nakagawa MM, Yoshida K, Shiozawa Y, Morita M, Yoshizato T, Sanada M, Nakayama M, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. *Blood.* 2018 Feb 8;131(6):621-635. doi: 10.1182/blood-2017-01-762393.

40. Kramann R, Schneider RK, DiRocco DP, Machado F, Fleig S, Bondzie PA, Henderson JM, Ebert BL, Humphreys BD. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2015 Jan 8;16(1):51-66. doi: 10.1016/j.stem.2014.11.004. Epub 2014 Nov 20.
41. Kramann R, Schneider RK. The identification of fibrosis-driving myofibroblast precursors reveals new therapeutic avenues in myelofibrosis. *Blood*. 2018 May 10;131(19):2111-2119. doi: 10.1182/blood-2018-02-834820.
42. Kramer F, Dervede J, Mezheyeuski A, Tauber R, Micke P, Kappert K. Platelet-derived growth factor receptor beta activation and regulation in murine myelofibrosis. *Haematologica*. 2020 Aug;105(8):2083-2094. doi: 10.3324/haematol.2019.226332. Epub 2019 Oct 31.
43. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. *Br J Haematol*. 2007 Nov;139(3):351-62. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06807.x.
44. Kuter DJ, Mufti GJ, Bain BJ, Hasserjian RP, Davis W, Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. *Blood*. 2009 Oct 29;114(18):3748-56. doi: 10.1182/blood-2009-05-224766. Epub 2009 Aug 11.
45. Lannutti BJ, Epp A, Roy J, Chen J, Josephson NC. Incomplete restoration of Mpl expression in the mpl^{-/-} mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. *Blood*. 2009 Feb 19;113(8):1778-85. doi: 10.1182/blood-2007-11-124859. Epub 2008 Sep 16.
46. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Patnaik M, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Tefferi A. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*. 2012 Nov 15;120(20):4168-71. doi: 10.1182/blood-2012-05-429696.
47. Lau WW, Hannah R, Green AR, Göttgens B. The JAK-STAT signaling pathway is differentially activated in CALR-positive compared with JAK2V617F-positive ET patients. *Blood*. 2015 Mar 5;125(10):1679-81. doi: 10.1182/blood-2014-12-618074.
48. Lee SC, North K, Kim E, Jang E, Obeng E, Lu SX, Liu B, Inoue D, Yoshimi A, Ki M, Yeo M, Zhang XJ, Kim MK, Cho H, Chung YR, Taylor J, Durham BH, Kim YJ, Pastore A, Monette S, Palacino J, Seiler M, Buonamici S, Smith PG, Ebert BL, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Synthetic Lethal and Convergent Biological Effects of Cancer-Associated Spliceosomal Gene Mutations. *Cancer Cell*. 2018 Aug 13;34(2):225-241.e8. doi: 10.1016/j.ccell.2018.07.003.
49. Lee TS, Ma W, Zhang X, Kantarjian H, Albitar M. Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struct Biol*. 2009 Sep 10;9:58.
50. Lehmann U, Bartels S, Hasemeier B, Geffers R, Schlue J, Büsche G, Hussein K, Kreipe H. SRSF2 mutation is present in the hypercellular and prefibrotic stage of primary myelofibrosis. *Blood*. 2013 May 9;121(19):4011-2. doi: 10.1182/blood-2012-11-467662.
51. Leimkühler NB, Gleitz HFE, Ronghui L, Snoeren IAM, Fuchs SNR, Nagai JS, Banjanin B, Lam KH, Vogl T, Kuppe C, Stalmann USA, Büsche G, Kreipe H, Gütgemann I, Krebs P, Banz Y, Boor P, Tai EW, Brümmendorf TH, Koschmieder S, Crysandt M, Bindels E, Kramann R, Costa IG, Schneider RK. Heterogeneous bone-marrow stromal progenitors drive myelofibrosis via a druggable alarmin axis. *Cell Stem Cell*. 2021 Apr 1;28(4):637-652.e8. doi: 10.1016/j.stem.2020.11.004
52. Ma W, Kantarjian H, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh CH, O'Brien S, Giles F, Bruey JM, Albitar M. JAK2 exon 14 deletion in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *PLoS One*. 2010 Aug 13;5(8):e12165. doi: 10.1371/journal.pone.0012165.
53. Maekawa T, Kato S, Kawamura T, Takada K, Sone T, Ogata H, Saito K, Izumi T, Nagao S, Takano K, Okada Y, Tachi N, Teramoto M, Horiuchi T, Hikota-Saga R, Endo-Umeda K, Uno S, Osawa Y, Kobayashi A, Kobayashi S, Sato K, Hashimoto M, Suzu S, Usuki K, Morishita S, Araki M, Makishima M, Komatsu N, Kimura F. Increased SLAMF7(high) monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2V617F provide a therapeutic target of elotuzumab. *Blood*. 2019 Sep 5;134(10):814-825. doi: 10.1182/blood.2019000051. Epub 2019 Jul 3.

54. Malara A, Gruppi C, Abbonante V, Cattaneo D, De Marco L, Massa M, Iurlo A, Gianelli U, Balduini CL, Tira ME, Muro AF, Chauhan AK, Rosti V, Barosi G, Balduini A. EDA fibronectin-TLR4 axis sustains megakaryocyte expansion and inflammation in bone marrow fibrosis. *J Exp Med.* 2019 Mar 4;216(3):587-604. doi: 10.1084/jem.20181074. Epub 2019 Feb 7.
55. Manshouri T, Verstovsek S, Harris DM, Veletic I, Zhang X, Post SM, Bueso-Ramos CE, Estrov Z. Primary myelofibrosis marrow-derived CD14+/CD34- monocytes induce myelofibrosis-like phenotype in immunodeficient mice and give rise to megakaryocytes. *PLoS One.* 2019 Sep 30;14(9):e0222912. doi: 10.1371/journal.pone.0222912. eCollection 2019.
56. Marty C, Lacout C, Martin A, Hasan S, Jacquot S, Birling MC, Vainchenker W, Villeval JL. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood.* 2010 Aug 5;116(5):783-7. doi: 10.1182/blood-2009-12-257063.
57. Martyré MC, Magdelenat H, Bryckaert MC, Laine-Bidron C, Calvo F. Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 1991 Jan;77(1):80-6. doi: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb07952.x.
58. Masselli E, Carubbi C, Gobbi G, Mirandola P, Galli D, Martini S, Bonomini S, Crugnola M, Craviotto L, Aversa F, Vitale M. Protein kinase Ce inhibition restores megakaryocytic differentiation of hematopoietic progenitors from primary myelofibrosis patients. *Leukemia.* 2015 Nov;29(11):2192-201. doi: 10.1038/leu.2015.150. Epub 2015 Jun 19.
59. Matsuura S, Thompson CR, Ng SK, Ward CM, Karagianni A, Mazzeo C, Malara A, Balduini A, Ravid K. Adhesion to fibronectin via alpha5beta1 integrin supports expansion of the megakaryocyte lineage in primary myelofibrosis. *Blood.* 2020 Jun 18;135(25):2286-2291. doi: 10.1182/blood.2019004230.
60. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, Chen CI, Anekalla KR, Joshi N, Williams KJN, Abdala-Valencia H, Yacoub TJ, Chi M, Chiu S, Gonzalez-Gonzalez FJ, Gates K, Lam AP, Nicholson TT, Homan PJ, Soberanes S, Dominguez S, Morgan VK, Saber R, Shaffer A, Hinchcliff M, Marshall SA, Bharat A, Berdnikovs S, Bhorade SM, Bartom ET, Morimoto RI, Balch WE, Sznajder JL, Chandel NS, Mutlu GM, Jain M, Gottardi CJ, Singer BD, Ridge KM, Bagheri N, Shilatifard A, Budinger GRS, Perlman H. Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med.* 2017 Aug 7;214(8):2387-2404.
61. Moore BB, Paine R 3rd, Christensen PJ, Moore TA, Sitterding S, Ngan R, Wilke CA, Kuziel WA, Toews GB. Protection from pulmonary fibrosis in the absence of CCR2 signaling. *J Immunol.* 2001 Oct 15;167(8):4368-77. doi: 10.4049/jimmunol.167.8.4368.
62. Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, Heidel FH, Purdon A, Vu T, Austin R, Heckl D, Breyfogle LJ, Kuhn CP, Kalaitzidis D, Armstrong SA, Williams DA, Hill GR, Ebert BL, Lane SW. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-alpha in a murine model of polycythemia vera. *Blood.* 2013 May 2;121(18):3692-702. doi: 10.1182/blood-2012-05-432989. Epub 2013 Mar 13.
63. Nauroy P, Delhommeau F, Baklouti F. JAK2V617F mRNA metabolism in myeloproliferative neoplasm cell lines. *Blood Cancer J.* 2014 Jun 27;4(6):e222. doi: 10.1038/bcj.2014.43.
64. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, Baxter EJ, Massie CE, Papaemmanuil E, Menon S, Godfrey AL, Dimitropoulou D, Guglielmelli P, Bellosillo B, Besses C, Döhner K, Harrison CN, Vassiliou GS, Vannucchi A, Campbell PJ, Green AR. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2015 Feb 12;372(7):601-612. doi: 10.1056/NEJMoa1412098.
65. Ozono Y, Shide K, Kameda T, Kamiunten A, Tahira Y, Sekine M, Akizuki K, Nakamura K, Iwakiri H, Sueta M, Hidaka T, Kubuki Y, Yamamoto S, Hasuie S, Sawaguchi A, Nagata K, Shimoda K. Neoplastic fibrocytes play an essential role in bone marrow fibrosis in Jak2V617F-induced primary myelofibrosis mice. *Leukemia.* 2021 Feb;35(2):454-467. doi: 10.1038/s41375-020-0880-3. Epub 2020 May 29.
66. Pecquet C, Diaconu CC, Staerk J, Girardot M, Marty C, Royer Y, Defour JP, Dusa A, Besancenot R, Giraudier S, Villeval JL, Knoops L, Courtoy PJ, Vainchenker W, Constantinescu SN. Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood.* 2012 May 17;119(20):4625-35. doi: 10.1182/blood-2011-08-372524. Epub 2012 Feb 29.

67. Psaila B, Wang G, Rodriguez-Meira A, Li R, Heuston EF, Murphy L, Yee D, Hitchcock IS, Sousos N, O'Sullivan J, Anderson S, Senis YA, Weinberg OK, Calicchio ML; NIH Intramural Sequencing Center, Iskander D, Royston D, Milojkovic D, Roberts I, Bodine DM, Thongjuea S, Mead AJ. Single-Cell Analyses Reveal Megakaryocyte-Biased Hematopoiesis in Myelofibrosis and Identify Mutant Clone-Specific Targets. *Mol Cell*. 2020 May 7;78(3):477-492.e8. doi: 10.1016/j.molcel.2020.04.008.
68. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, Bass AJ, Pretz J, Ahn J, Hricik T, Kilpivaara O, Wadleigh M, Busque L, Gilliland DG, Golub TR, Ebert BL, Levine RL. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*. 2014 May 29;123(22):e123-33. doi: 10.1182/blood-2014-02-554634. Epub 2014 Apr 16.
69. Rao TN, Hansen N, Stetka J, Luque Paz D, Kalmer M, Hilfiker J, Endeke M, Ahmed N, Kubovcakova L, Rybarikova M, Hao-Shen H, Geier F, Beisel C, Dirnhofer S, Schroeder T, Brümmendorf TH, Wolf D, Koschmieder S, Skoda RC. JAK2-V617F and interferon- α induce megakaryocyte-biased stem cells characterized by decreased long-term functionality. *Blood*. 2021 Apr 22;137(16):2139-2151. doi: 10.1182/blood.2020005563.
70. Rontautoli S, Castellano S, Guglielmelli P, Zini R, Bianchi E, Genovese E, Carretta C, Parenti S, Fantini S, Mallia S, Tavernari L, Sartini S, Mirabile M, Mannarelli C, Gesullo F, Pacilli A, Pietra D, Rumi E, Salmoiraghi S, Mora B, Villani L, Grilli A, Rosti V, Barosi G, Passamonti F, Rambaldi A, Malcovati L, Cazzola M, Biccato S, Tagliafico E, Vannucchi AM, Manfredini R. Gene expression profile correlates with molecular and clinical features in patients with myelofibrosis. *Blood Adv*. 2021 Mar 9;5(5):1452-1462. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003614.
71. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47954-63. doi: 10.1074/jbc.M205156200.
72. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell*. 2003 Apr;14(4):1448-59. doi: 10.1091/mbc.e02-06-0342.
73. Sakr H, Clark Schneider K, Murugesan G, Bodo J, Hsi ED, Cook JR. pSTAT3/pSTAT5 Signaling Patterns in Molecularly Defined Subsets of Myeloproliferative Neoplasms. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018 Feb;26(2):147-152.
74. Sangkhae V, Etheridge SL, Kaushansky K, Hitchcock IS. The thrombopoietin receptor, MPL, is critical for development of a JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2014 Dec 18;124(26):3956-63. doi: 10.1182/blood-2014-07-587238. Epub 2014 Oct 22.
75. Sashida G, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med*. 2016 Jul 25;213(8):1459-77. doi: 10.1084/jem.20151121. Guo Y, Zhou Y, Yamamoto S, Yang H, Zhang P, Chen S, Nimer SD, Zhao ZJ, Xu M, Bai J, Yang FC. ASXL1 alteration cooperates with JAK2V617F to accelerate myelofibrosis. *Leukemia*. 2019 May;33(5):1287-1291. doi: 10.1038/s41375-018-0347-y.
76. Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanogoh A, Akira S. Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*. 2017 Jan 5;541(7635):96-101. doi: 10.1038/nature20611. Epub 2016 Dec 21.
77. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood*. 2000 Aug 15;96(4):1342-7. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, Bosco D, Gatta V, Rana RA, Langella V, Di Virgilio A, Vannucchi AM, Migliaccio AR. Increased and pathologic emperipoiesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1(low) mice. *Blood*. 2004 Dec 1;104(12):3573-80. doi: 10.1182/blood-2004-01-0193.
78. Schneider RK, Mullally A, Dugourd A, Peisker F, Hoogenboezem R, Van Strien PMH, Bindels EM, Heckl D, Büsche G, Fleck D, Müller-Newen G, Wongboonsin J, Ventura Ferreira M, Puelles VG, Saez-Rodriguez J, Ebert BL, Humphreys BD, Kramann R. Gli1⁺ Mesenchymal Stromal Cells Are a Key Driver of Bone Marrow

- Fibrosis and an Important Cellular Therapeutic Target. Cell Stem Cell. 2017 Jun 1;20(6):785-800.e8. doi: 10.1016/j.stem.2017.03.008.
79. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF-beta1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. J Clin Invest. 2004 Mar;113(5):676-85. doi: 10.1172/JCI19540.
 80. Shimizu T, Kubovcakova L, Nienhold R, Zmajkovic J, Meyer SC, Hao-Shen H, Geier F, Dirnhofer S, Guglielmelli P, Vannucchi AM, Feenstra JD, Kralovics R, Orkin SH, Skoda RC. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. J Exp Med. 2016 Jul 25;213(8):1479-96. doi: 10.1084/jem.20151136. Epub 2016 Jul 11.
 81. Smeets MF, Tan SY, Xu JJ, Anande G, Unnikrishnan A, Chalk AM, Taylor SR, Pimanda JE, Wall M, Purton LE, Walkley CR. Srsf2(P95H) initiates myeloid bias and myelodysplastic/myeloproliferative syndrome from hemopoietic stem cells. Blood. 2018 Aug 9;132(6):608-621. doi: 10.1182/blood-2018-04-845602.
 82. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Abbey NW, Herndier B, Goldsmith MA. STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. Blood. 2002 Jan 1;99(1):95-101. doi: 10.1182/blood.v99.1.95.
 83. Spangrude GJ, Lewandowski D, Martelli F, Marra M, Zingariello M, Sancillo L, Rana RA, Migliaccio AR. P-Selectin Sustains Extramedullary Hematopoiesis in the Gata1 low Model of Myelofibrosis. Stem Cells. 2016 Jan;34(1):67-82. doi: 10.1002/stem.2229. Epub 2015 Oct 23.
 84. Spiegel JY, McNamara C, Kennedy JA, Panzarella T, Arruda A, Stockley T, Sukhai M, Thomas M, Bartoszko J, Ho J, Siddiq N, Maze D, Schimmer A, Schuh A, Sibai H, Yee K, Claudio J, Devlin R, Minden MD, Kamel-Reid S, Gupta V. Impact of genomic alterations on outcomes in myelofibrosis patients undergoing JAK1/2 inhibitor therapy. Blood Adv. 2017 Sep 8;1(20):1729-1738. doi: 10.1182/bloodadvances.2017009530. eCollection 2017 Sep 12.
 85. Talpaz M, Kiladjian JJ. Fedratinib, a newly approved treatment for patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis. Leukemia. 2021 Jan;35(1):1-17. doi: 10.1038/s41375-020-0954-2. Epub 2020 Jul 9.
 86. Tamari R, Rapaport F, Zhang N, McNamara C, Kuykendall A, Sallman DA, Komrokji R, Arruda A, Najfeld V, Sandy L, Medina J, Litvin R, Famulare CA, Patel MA, Maloy M, Castro-Malaspina H, Giralto SA, Weinberg RS, Mascarenhas JO, Mesa R, Rondelli D, Dueck AC, Levine RL, Gupta V, Hoffman R, Rampal RK. Impact of High-Molecular-Risk Mutations on Transplantation Outcomes in Patients with Myelofibrosis. Biol Blood Marrow Transplant. 2019 Jun;25(6):1142-1151. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.01.002. Epub 2019 Jan 6.
 87. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Begna KH, Naseema Gangat, Pardanani A, Vannucchi AM. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia. 2018 Jul;32(7):1631-1642. doi: 10.1038/s41375-018-0107-z.
 88. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani A. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. Blood Adv. 2016 Nov 30;1(2):105-111. doi: 10.1182/bloodadvances.2016000208. eCollection 2016 Dec 13
 89. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. J Clin Oncol. 2011 Apr 1;29(10):1356-63. doi: 10.1200/JCO.2010.32.9490.
 90. Tiedt R, Coers J, Ziegler S, Wiestner A, Hao-Shen H, Bornmann C, Schenkel J, Karakhanova S, de Sauvage FJ, Jackson CW, Skoda RC. Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. Blood. 2009 Feb 19;113(8):1768-77. doi: 10.1182/blood-2008-03-146084. Epub 2008 Oct 9.
 91. Todisco G, Creignou M, Galli A, Guglielmelli P, Rumi E, Roncador M, Rizzo E, Nannya Y, Pietra D, Elena C, Bono E, Molteni E, Rosti V, Catricalá S, Sarchi M, Dimitriou M, Ungerstedt J, Vannucchi AM, Hellström-Lindberg E, Ogawa S, Cazzola M, Malcovati L. Co-mutation pattern, clonal hierarchy, and clone size concur

- to determine disease phenotype of SRSF2^{P95}-mutated neoplasms. *Leukemia*. 2020 Dec 21. doi: 10.1038/s41375-020-01106-z.
92. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb 9;129(6):667-679. doi: 10.1182/blood-2016-10-695940.
 93. Vallapureddy RR, Mudireddy M, Penna D, Lasho TL, Finke CM, Hanson CA, Ketterling RP, Begna KH, Gangat N, Pardanani A, Tefferi A. Leukemic transformation among 1306 patients with primary myelofibrosis: risk factors and development of a predictive model. *Blood Cancer J*. 2019 Jan 25;9(2):12. doi: 10.1038/s41408-019-0175-y
 94. Veletic I, Manshouri T, Newberry KJ, Garnett J, Verstovsek S, Estrov Z. Pentraxin-3 plasma levels correlate with tumour burden and overall survival in patients with primary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2019 Apr;185(2):382-386. doi: 10.1111/bjh.15528.
 95. Verstovsek S, Manshouri T, Pilling D, Bueso-Ramos CE, Newberry KJ, Prijic S, Knez L, Bozinovic K, Harris DM, Spaeth EL, Post SM, Multani AS, Rampal RK, Ahn J, Levine RL, Creighton CJ, Kantarjian HM, Estrov Z. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J Exp Med*. 2016 Aug 22;213(9):1723-40.
 96. Wagner-Ballon O, Pisani DF, Gastinne T, Tulliez M, Chaligné R, Lacout C, Auradé F, Villeval JL, Gonin P, Vainchenker W, Giraudier S. Proteasome inhibitor bortezomib impairs both myelofibrosis and osteosclerosis induced by high thrombopoietin levels in mice. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):345-53. doi: 10.1182/blood-2006-10-054502.
 97. Wakahashi K, Minagawa K, Kawano Y, Kawano H, Suzuki T, Ishii S, Sada A, Asada N, Sato M, Kato S, Shide K, Shimoda K, Matsui T, Katayama Y. Vitamin D receptor-mediated skewed differentiation of macrophages initiates myelofibrosis and subsequent osteosclerosis. *Blood*. 2019 Apr 11;133(15):1619-1629. doi: 10.1182/blood-2018-09-876615. Epub 2019 Feb 4.
 98. Walz C, Ahmed W, Lazarides K, Betancur M, Patel N, Hennighausen L, Zaleskas VM, Van Etten RA. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3550-60. doi: 10.1182/blood-2011-12-397554. Epub 2012 Jan 10.
 99. Weiskirchen R, Weiskirchen S, Tacke F. Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Mol Aspects Med*. 2019 Feb;65:2-15. doi: 10.1016/j.mam.2018.06.003. Epub 2018 Jun 30.
 100. Wen QJ, Yang Q, Goldenson B, Malinge S, Lasho T, Schneider RK, Breyfogle LJ, Schultz R, Gilles L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, Pardanani A, Stein B, Gurbuxani S, Mullally A, Levine RL, Tefferi A, Crispino JD. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat Med*. 2015 Dec;21(12):1473-80. doi: 10.1038/nm.3995.
 101. Wen QJ, Yang Q, Goldenson B, Malinge S, Lasho T, Schneider RK, Breyfogle LJ, Schultz R, Gilles L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, Pardanani A, Stein B, Gurbuxani S, Mullally A, Levine RL, Tefferi A, Crispino JD. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat Med*. 2015 Dec;21(12):1473-80. doi: 10.1038/nm.3995. Epub 2015 Nov 16.
 102. Woods B, Chen W, Chiu S, Marinaccio C, Fu C, Gu L, Bulic M, Yang Q, Zouak A, Jia S, Suraneni PK, Xu K, Levine RL, Crispino JD, Wen QJ. Activation of JAK/STAT Signaling in Megakaryocytes Sustains Myeloproliferation *In Vivo*. *Clin Cancer Res*. 2019 Oct 1;25(19):5901-5912. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4089. Epub 2019 Jun 19.
 103. Xu JJ, Smeets MF, Tan SY, Wall M, Purton LE, Walkley CR. Modeling human RNA spliceosome mutations in the mouse: not all mice were created equal. *Exp Hematol*. 2019 Feb;70:10-23. doi: 10.1016/j.exphem.2018.11.001. Epub 2018 Nov 6.
 104. Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood*. 2012 Apr 12;119(15):3539-49. doi: 10.1182/blood-2011-03-345215. Epub 2011 Dec 5. PMID: 22144185
 105. Yan D, Jobe F, Hutchison RE, Mohi G. Deletion of Stat3 enhances myeloid cell expansion and increases the severity of myeloproliferative neoplasms in Jak2V617F knock-in mice. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):2050-61. doi: 10.1038/leu.2015.116. Epub 2015 May 18.

106. Yanagida M, Ide Y, Imai A, Toriyama M, Aoki T, Harada K, Izumi H, Uzumaki H, Kusaka M, Tokiwa T. The role of transforming growth factor-beta in PEG-rHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats. Br J Haematol. 1997 Dec;99(4):739-45. doi: 10.1046/j.1365-2141.1997.4843288.x.
107. Yang Y, Akada H, Nath D, Hutchison RE, Mohi G. Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. Blood. 2016 Jun 30;127(26):3410-23. doi: 10.1182/blood-2015-11-679431.
108. Yoshimi A, Lin KT, Wiseman DH, Rahman MA, Pastore A, Wang B, Lee SC, Micol JB, Zhang XJ, de Botton S, Penard-Lacronique V, Stein EM, Cho H, Miles RE, Inoue D, Albrecht TR, Somerville TCP, Batta K, Amaral F, Simeoni F, Wilks DP, Cargo C, Intlekofer AM, Levine RL, Dvinge H, Bradley RK, Wagner EJ, Krainer AR, Abdel-Wahab O. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. Nature. 2019 Oct;574(7777):273-277. doi: 10.1038/s41586-019-1618-0. Epub 2019 Oct 2.
109. Yue L, Bartenstein M, Zhao W, Ho WT, Han Y, Murdun C, Mailloux AW, Zhang L, Wang X, Budhathoki A, Pradhan K, Rapaport F, Wang H, Shao Z, Ren X, Steidl U, Levine RL, Zhao ZJ, Verma A, Epling-Burnette PK. Efficacy of ALK5 inhibition in myelofibrosis. JCI Insight. 2017 Apr 6;2(7):e90932. doi: 10.1172/jci.insight.90932.
110. Zahn M, Marienfeld R, Melzner I, Heinrich J, Renner B, Wegener S, Mießner A, Barth TF, Dorsch K, Brüderlein S, Möller P. A novel PTPN1 splice variant upregulates JAK/STAT activity in classical Hodgkin lymphoma cells. Blood. 2017 Mar 16;129(11):1480-1490. doi: 10.1182/blood-2016-06-720516. Epub 2017 Jan 12.
111. Zhang J, Lieu YK, Ali AM, Penson A, Reggio KS, Rabadan R, Raza A, Mukherjee S, Manley JL. Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Aug 25;112(34):E4726-34. doi: 10.1073/pnas.1514105112. Epub 2015 Aug 10.

Supplemental Table 1:

Cell surface staining for flow cytometry					
Organ	Staining	Fluorochrome	Company	Clone	Reference product
BM/Spleen	Lin+ (CD3e, CD11b, B220, TER119, Mac1)	PE	Biolegend		133303
BM/Spleen	Sca 1	PE-Cy7	Biolegend	D7	108114
BM/Spleen	Kit	APC	BD	2B8	553356
BM/Spleen	CD34	FITC	BD	RAM34	553733
BM/Spleen	CD16/32	BV421	Biolegend	93	101331
BM/Spleen	CD48	APC-Cy7	Biolegend	HM48-1	103432
BM/Spleen	CD150	PE/Dazzle 594	Biolegend	TC15-12F12.2	115936
BM/Spleen	CD41	BV510	Biolegend	MWReg30	133923
BM/Spleen	CD41	PE	BD	MWReg30	558040
BM/Spleen	CD42d	PerCP-Cy5.5	Biolegend	1C2	148508
BM/Spleen	CD42d	APC	Biolegend	1C2	148506
BM/Spleen	MPL	<i>Biotin</i>	IBL/Tecan	AMM2	JP10403
BM/Spleen	<i>Streptavidin</i>	BB515	BD		564453
BM/Spleen	CD71	PE-Cy7	Biolegend	RI7217	113812
BM/Spleen/Blood	TER119	BV605	BD	Ter-119	747740
BM/Spleen/Blood	CD45	PE-CF594	BD	30-F11	562420
Blood	CD45.1	BV711	Biolegend	A20	110739
Blood	CD45.2	BV785	Biolegend	104	109839
BM/Spleen/Blood	CD11b	PE	Biolegend	M1/70	101208
Blood	CD11b	PE/Dazzle 594	Biolegend	M1/70	101256
BM/Spleen/Blood	Ly6G	APC-Cy7	BD	Clone 1A8	560600
Blood	Ly6C	APC	Biolegend	Clone HK1.4	128016
Blood	B220	BV510	BD	RA3-6B2	563103
Blood	B220	PE	Biolegend	RA3-6B2	103208
Blood	CD3	BV421	BD	500A2	740014
Blood	CD3	PE	Biolegend	500A2	152310
Blood	NKp46	FITC	BD	29A1.4	560756
Blood	NKP46	PE	Biolegend	29A1.4	137604

**Cell surface staining
for spectral flow
cytometry**

Staining	Fluorochrome	Company	Clone	Reference product
CD42d	APC	Biologend	1C2	148506
CD48	APC/Fire 750	Biologend	HM48-1	103446
MPL	<i>Biotin</i>	IBL/Tecan	AMM2	JP10403
Streptavidin	APC-R700			
F4/80	Alexa Fluor 594	Biologend	BM8	123140
CD41	Alexa Fluor 647	Biologend	MWReg30	133934
CD45	BUV395	BD	Clone 30-F11	564279
Ly-6G	BUV563	BD	1A8	612921
CD16/CD32	BUV661	BD	190909	750433
CD11b	BUV737	BD	M1/70	612800
CD182 (CXCR2)	BUV805	BD	V48-2310	748679
CD319 (SLAMF7)	BV421	BD	4G2	747997
CD103	BV510	Biologend	2,00E+07	121423
CD8a	BV570	Biologend	56-6.7	100740
CD34	BV605	BD	RAM34	750918
CD317 (BST2, PDCA-1)	BV711	Biologend	927	127039
XCR1	BV785	Biologend	ZET	148225
CD170 (Siglec-F)	FITC	Biologend	S17007L	155504
CD3ε	PE	Biologend	500A2	152310
CD45R/B220	PE	Biologend	RA3-6B2	103208
Ter119				
Lin				
CD135 (FLT3)	PE/Cy5	Biologend	A2F10	135312
CD184 (CXCR4)	PE-Vio770	Miltenyi	REA107	130-102-160
CD150	PE/Dazzle594	Biologend	TC15-12F12.2	115936
Ly-6C	PerCP/Cy5.5	Thermo Fischer	HK1.4	45-5932-82
I-A/I-E	Spark Blue 550	Biologend	M5/114.15.2	107662
CD117	Spark NIR 685	Biologend	2B8	105856
CD11c	Super Bright 645	Thermo Fischer	N418	64-0114-82
CD11a	eFluor 450	Thermo Fischer	M17/4	48-0111-82

Cell surface staining for mass cytometry				
Isotope	Staining	clone	Company	Reference antibody
89 Y	CD45	30-F11	Fluidigm	3089005C
164 Dy	Ly6A/E (Sca-1)	D7	Fluidigm	3164005C
173 Yb	CD117 (cKit)	2B8	Fluidigm	3173004C
154 Sm	CD48	HM48.1	Fluidigm	315400B
167 Er	CD150	TC15	Biolegend (isotope conjugation by AbLab)	3167004B
170 Er	CD34	RAM34	BD (isotope conjugation by AbLab)	BD553731
150 Nd	CD135	A2F10.1	eBio/ThermoFisher (isotope conjugation by AbLab)	TF14-1351-82
143 Nd	CD41	MXReg30	DVS Sciences	3143009B
168 Er	MPL	AMM2	IBL (isotope conjugation by AbLab)	IBL10401F
151 Eu	CD42d	1C2	Fluidigm	
145 Nd	CD3	17A	Biolegend (isotope conjugation by AbLab)	BL100202
144 Nd	CD45R (B220)	RA3-6B2	Fluidigm	3144011C
174 Yb	Ly6G/C (Gr-1)	RB6-8C5	DVS Sciences	3174008B
148 Nd	CD11b	M1/70	Fluidigm	3148003C

Intracellular staining				
Isotope	Staining	clone	Company	Reference product
147 Sm	pSTAT5 (Y694)	clone 47	Fluidigm	3147012A
158 Gd	pSTAT3 (Y705)	Y705	Fluidigm	3158005A
162 Dy	STAT3	124H6	Cell Signalling (isotope conjugation by AbLab)	CST91395
153 Eu	pSTAT1 (Y701)	4A	Fluidigm	3153005A
152 Sm	pAKT (S473)	D9E	Fluidigm	3152005A
171 Yb	pERK1/2 (T202/Y204)	D13.14.4E	Fluidigm	3171010A
161 Dy	JAK2	D2E12	Cell Signalling (isotope conjugation by AbLab)	CST3230BF
172 Yb	KI67	B56	BD (isotope conjugation by AbLab)	BD556003

Discussion et perspectives

A l'issue de ce travail, la thèse que je défends est que, dans le système hématopoïétique de la souris, l'acquisition d'une mutation P95H du gène *Srsf2* au sein d'un clone *Jak2*^{V617F} ralentit la contribution des cellules double-mutées à l'installation d'une myélofibrose (et favorise la persistance de cellules souches hématopoïétiques sur le long terme). Cet effet est en lien avec la modification du phénotype mégacaryocytaire *Jak2*^{V617F}, notamment du fait d'un épissage anormal de l'exon 14 du gène *Jak2* affectant la signalisation intracellulaire et la production de TGFβ.

JAK2^{V617F} est le variant somatique le plus souvent détecté dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques, hors leucémie myéloïde chronique. La mutation d'un gène codant une protéine du complexe d'épissage des pré-ARN messagers est communément détectée dans diverses hémopathies myéloïdes du sujet âgé, dont les néoplasmes myéloprolifératifs. L'analyse de données cliniques corrélatives nous indique que, dans le contexte d'une mutation JAK2^{V617F}, la détection d'une mutation associée du gène *SRSF2* est plus fréquente lorsqu'il existe une fibrose médullaire que dans les néoplasmes myéloprolifératifs moins agressifs (PV ou TE) et semble associée à un risque accru de transformation en leucémie aiguë.

- Un modèle murin exprimant simultanément *Jak2*^{V617F} et *Srsf2*^{P95H}

Pour étudier plus précisément les interactions entre ces deux variants, nous avons généré un modèle murin knock-in conditionnel dans lequel la recombinase Cre s'exprime sous le contrôle du promoteur du gène *Scf* après ingestion de tamoxifène. Ce modèle se caractérise par l'expression simultanée des deux mutations dans les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques. C'est à la fois une limite – ces mutations apparaissent séquentiellement dans le clone transformé au cours de la maladie humaine – et un avantage – cette situation permet de focaliser notre analyse sur l'interaction entre les deux mutations dans une population cellulaire génétiquement plus homogène.

Le modèle murin KI *Jak2*^{V617F} hétérozygote que nous avons utilisé évolue en 2 phases, une phase polyglobulique avec thrombocytose suivie de l'installation progressive d'une myélofibrose. Cette dynamique évolutive est affectée très progressivement par l'addition d'une mutation *Srsf2*^{P95H} hétérozygote au variant *Jak2*^{V617F}. C'est la raison pour laquelle nous avons pris soin de définir le moment auquel chaque analyse a été réalisée en distinguant 4 phases : 1) une phase précoce correspondant aux 3 premières semaines après ingestion de tamoxifène, 2) une phase intermédiaire correspondant à la myéloprolifération qui est particulièrement nette entre 8 et 10 semaines après ingestion de tamoxifène, 3) une phase tardive, myélofibrosante, située entre 16 et 24 semaines après ingestion de tamoxifène, et 4) une phase très tardive décrivant les effets des transplantations sériées.

Notre modèle murin présente des limites et d'autres modèles pourraient être utilisés pour confirmer nos résultats. L'une des découvertes de ce travail de thèse, qui peut modifier l'interprétation des résultats, concerne la nécessité de réaliser des prélèvements sanguins fréquents afin de limiter la mortalité des souris induite par l'hyperviscosité sanguine (polyglobulie), à l'image des phlébotomies réalisées chez les patients atteints de PV. En effet, nous avons pu observer une survie très limitée du modèle murin exprimant *Jak2*^{V617F} sous le contrôle de *Scf*, la mort des souris étant souvent reliée à un hémothorax ou un hémopéritoine. Des modifications des parois vasculaires ont été décrites chez la souris (avec formation d'anévrisme de l'aorte par infiltration de macrophages pathologiques) et

pourraient expliquer cette observation.²⁷² Outre l'effet de $Jak2^{V617F}$ sur les cellules macrophagiques qui infiltrent la paroi vasculaire, une autre explication possible est liée à l'utilisation du gène *Scl* comme promoteur, qui certes est exprimé majoritairement dans les CSH mais potentiellement aussi dans les cellules endothéliales. L'expression de $Jak2^{V617F}$ par des cellules endothéliales a également été décrite comme délétère en favorisant la formation de thrombus.²⁷³ Concernant le choix du gène *Scl* comme promoteur de l'induction de $Jak2^{V617F}$, il serait intéressant d'utiliser d'autres gènes tels que *Mx1* ou *Vav*, permettant également l'expression des mutations dans le tissu hématopoïétique. Une autre limite de notre modèle concerne la construction du knock-in de $Jak2^{V617F}$. Différentes constructions génétiques ont été décrites pour faire exprimer $Jak2^{V617F}$ dans le système hématopoïétique murin. Notre modèle permet d'exprimer une version murine de $Jak2^{V617F}$ à l'état hétérozygote et il pourrait être intéressant de valider nos résultats à l'aide de construction humaine $JAK2^{V617F}$, à l'état homozygote voire utiliser un modèle rétroviral permettant d'évaluer le rôle de la charge allélique $Jak2^{V617F}$. De manière analogue, nous avons utilisé le modèle murin *Srsf2*^{P95H} établi dans le laboratoire d'Omar Abdel-Wahab.¹⁷⁴ Or, d'autres modèles knock-in de *Srsf2*^{P95H} ont été établis, avec des variations phénotypiques particulièrement marquées dans le modèle australien, attestant de l'importance du type de construction génique dans l'interprétation des résultats.¹⁷⁷ On notera au passage que le phénotype des souris *Srsf2*^{P95H} *Scl*-Cre de notre étude présente un phénotype hématologique beaucoup moins marqué que celui des souris *Srsf2*^{P95H} *Mx1*-Cre, s'agissant pourtant de la même construction knock-in. Concernant *Srsf2*^{P95H} toujours, l'un des paramètres partiellement étudiés dans notre travail demeure le vieillissement. En effet, l'ensemble des souris utilisées pour ces expérimentations étaient âgées de 2-3 mois à l'ingestion de tamoxifène et il eut été intéressant d'étudier le rôle de *Srsf2*^{P95H} chez des souris beaucoup plus âgées (impact sur les CSH et du micro-environnement médullaire âgé). Enfin, il serait judicieux (mais fastidieux) d'étudier l'impact d'une perte de fonction de *Tet2* ou d'*Asxl1* sur notre modèle, les mutations de ces 2 gènes étant les plus fréquemment retrouvées cas de NMP $JAK2^{V617F}$ *SRSF2*^{P95H}.

- **Le phénotype observé distingue *Srsf2*^{P95H} des autres mutations associées à $Jak2^{V617F}$.**

L'association d'une mutation *Srsf2*^{P95H} à $Jak2^{V617F}$ perturbe peu le développement initial du syndrome myéloprolifératif induit par $Jak2^{V617F}$. Dans les phases précoce et intermédiaire, les souris double mutantes présentent un phénotype polyglobulique avec thrombocytose très similaire à celui des souris $Jak2^{V617F}$ ou très discrètement altéré, *Srsf2*^{P95H} atténuant très légèrement le phénotype myéloprolifératif induit par $Jak2^{V617F}$. Après 4-6 mois de suivi, l'impact de *Srsf2*^{P95H} devient net : alors que le chiffre des plaquettes diminue dans le sang des souris $Jak2^{V617F}$ du fait du développement d'une fibrose médullaire de grade II, ce chiffre continue à augmenter chez les souris double mutées (*Srsf2*^{P95H} / $Jak2^{V617F}$) chez lesquelles la fibrose médullaire reste modeste (grade I). Ce phénotype dans lequel la mutation *Srsf2*^{P95H} ralentit le développement de la fibrose médullaire est une surprise car les autres mutations dont l'association à $Jak2^{V617F}$ a été étudiée (perte de fonction d'*Ezh2*, d'*Asxl1* ou de *Dnmt3a*) étaient associées à une aggravation du phénotype généré par $Jak2^{V617F}$ seul.

Cette observation est donc inattendue pour deux raisons :

Dans la pathologie humaine, c'est le plus souvent dans le contexte d'une fibrose médullaire installée ou en développement que l'on détecte un variant *SRSF2*^{P95} associé à $JAK2^{V617F}$. Or, nos résultats suggèrent que l'acquisition d'un variant sous-clonal *SRSF2*^{P95H} n'est pas responsable de l'évolution d'une PV ou d'une TE vers une fibrose médullaire secondaire. Cela pourrait indiquer qu'une mutation

additionnelle *SRSF2*^{P95} peut être acquise dans le contexte d'une évolution fibrosante sans contribuer à cette évolution. Le mécanisme de sélection du sous-clone ayant acquis cette mutation reste mal compris. Il pourrait impliquer des mutations additionnelles, ou des effets génétiques, épigénétiques ou sur l'environnement du clone qui sont propres à l'espèce humaine.

Parmi les modifications d'épissage induites par la mutation *Srsf2*^{P95}, celle du gène *Ezh2* semblait promouvoir la dégradation de l'ARN messager correspondant par un processus dit « nonsense-mediated decay » (un processus de contrôle-qualité des ARNm qui élimine ceux qui contiennent un codon stop trop précoce), provoquant une perte d'expression de la protéine correspondante. Ces données permettent d'expliquer le caractère mutuellement exclusif (par redondance) des mutations de *SRSF2* et d'*EZH2* dans les hémopathies humaines. Or, dans un modèle murin, la perte de fonction d'*Ezh2* accroît le développement d'une fibrose médullaire induit par *Jak2*^{V617F}. Dans les mégacaryocytes de notre modèle murin *Jak2*^{V617F} *Srsf2*^{P95H}, nous n'avons pas observé le saut d'exon d'*Ezh2* décrit dans d'autres cellules de ce modèle créé aux Etats-Unis. D'autre part, ce saut d'exon n'a pas été détecté dans les modèles murins créés respectivement au Japon et en Australie, limitant le caractère absolu de la perte de fonction d'*Ezh2* induit par *Srsf2*^{P95H}.

- **Le variant *Srsf2*^{P95} ne favorise pas la transformation leucémique des cellules *Jak2*^{V617F} à court terme**

Les analyses corrélatives indiquent que l'acquisition d'un variant *SRSF2*^{P95} chez un patient atteints de NMP *JAK2*^{V617F} est associée à une réduction de son espérance de vie. La coopération décrite entre *Srsf2*^{P95H} et *Idh2*^{R140Q} chez la souris, et l'impact du vieillissement sur l'évolution de l'hématopoïèse *Srsf2*^{P95H} dans le modèle murin australien laissent penser que nous observerions une coopération leucémogénique de *Srsf2*^{P95H} avec *Jak2*^{V617F} dans les CSH. Or, nous n'avons observé aucune transformation en leucémie aiguë myéloïde dans les 6 mois qui suivent une première transplantation ou pendant les 15 mois de suivi des transplantations sériées.

Initialement, l'association *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} ne modifie pas significativement les proportions de CSH, en particulier de SLAM. Après 6 mois d'évolution, en revanche, il existe une augmentation significative de la proportion de SLAM chez les souris *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} par rapport aux souris *Jak2*^{V617F}, mais ces données (non montrées) sont potentiellement biaisées par la différence observée en terme de fibrose médullaire et splénique. Sur le plan fonctionnel, *Srsf2*^{P95H} confère un léger désavantage compétitif à l'hématopoïèse *Jak2*^{V617F}, suffisant pour qu'elle soit rapidement moins compétitive par rapport à une hématopoïèse *Jak2*^{V617F} isolée. Dans ce cas, la possibilité de l'émergence (et de la dominance clonale) d'une hématopoïèse *JAK2*^{V617F} / *SRSF2*^{P95H} chez l'homme nécessite probablement un contexte particulier, qu'il soit intrinsèque (acquisition de variants supplémentaires, par exemple épigénétiques tels que *TET2* ou *ASXL1*) ou extrinsèque (vieillesse du micro-environnement).

- **Le variant *Srsf2*^{P95} semble prévenir l'épuisement des cellules souches *Jak2*^{V617F}.**

De manière intéressante, les transplantations sériées ont révélé que l'acquisition d'une mutation de *Srsf2* prévient l'épuisement des CSH *Jak2*^{V617F}. Ces dernières ne sont plus à même de renouveler l'hématopoïèse après la 3^{ème} transplantation sériée. Ce phénomène décrit dans les modèles murins KI *Jak2*^{V617F} est corrélé au niveau d'expression de *Jak2*^{V617F} et expliqué par une augmentation de la mise en cycle des CSH et des progéniteurs *Jak2*^{V617F}.⁸⁷ Or, nous observons la persistance d'une

hématopoïèse Jak2^{V617F} / Srsf2^{P95H} après la 3^{ème} transplantation. Ceci évoque un effet « protecteur » de Srsf2^{P95H} dans les CSH et devrait favoriser la persistance d'une hématopoïèse Jak2^{V617F} Srsf2^{P95H}, voir conférer un avantage compétitif sur le long terme aux cellules portant les deux mutations par rapport à celles n'en portant qu'une seule.

Ces résultats pourraient s'expliquer par une diminution de l'expression d'une forme fonctionnelle de JAK2 (conséquence d'un épissage anormal du gène par un complexe d'épissage contenant la protéine SRSF2 mutée), une explication sur laquelle nous reviendrons. Notre analyse a plusieurs limites : 1. il aurait été informatif de comparer le cycle cellulaire des LSK ou des SLAM Jak2^{V617F} en l'absence et en présence de Srsf2^{P95H} ; 2. cette expérience d'une durée totale de 16 mois, n'a été réalisée qu'une seule fois et aurait bénéficié d'une répétition ; 3. Il aurait été plus rigoureux de réaliser des greffes compétitives à partir de LSK triées (voire de SLAM) plutôt que de cellules de moelle totale, dont les proportions peuvent être modifiées par l'apparition d'une fibrose médullaire ; et 4. Il aurait été aussi approprié d'utiliser les techniques de greffe en dilution limite pour évaluer la capacité à long terme de repopulation d'une hématopoïèse Jak2^{V617F} / Srsf2^{P95H}.

- **Les monocytes ne semblent pas en cause dans la réduction de la myélofibrose.**

Afin de mieux comprendre le retard au développement de la fibrose médullaire engendré par Srsf2^{P95H} sur un fond génétique Jak2^{V617F}, nous nous sommes intéressés aux deux principaux types cellulaires impliqués dans le développement du processus fibrotique au sein de la moelle osseuse hématopoïétique que sont les monocytes et les mégacaryocytes.

L'étude des populations monocytaires n'a pas mis en évidence de différence de répartition en fonction de la présence d'une mutation Jak2^{V617F} et/ou Srsf2^{P95H} aux temps les plus précoces. Aux temps plus tardifs, la mutation Jak2^{V617F} provoque une augmentation de la proportion de monocytes non classiques (Ly6G⁻, Cd11b⁺, Ly6C⁻) au détriment des monocytes classiques (Ly6G⁺, Cd11b⁺, Ly6C⁺) (résultats non montrés), un effet corrélé à l'apparition de la fibrose médullaire et discrètement atténué par la présence de Srsf2^{P95H}. Il est difficile de déterminer si ce phénomène est une cause ou une conséquence de la fibrose médullaire. Quoiqu'il en soit, nous n'avons pas détecté de différence d'expression de la protéine SLAMF7 à la surface des sous-populations monocytaires en fonction du génotype, contrairement à ce qui a été rapporté dans le contexte de la mutation Jak2^{V617F}.²⁵⁵

Les résultats de nos propres travaux n'identifient pas un rôle essentiel des monocytes dans l'apparition de la fibrose médullaire. Cependant, nos travaux sont restés focalisés sur les monocytes sans explorer d'éventuelles modifications des macrophages médullaires dans le développement de la fibrose.

- **Les mégacaryocytes ont un rôle important dans le ralentissement de la myélofibrose secondaire médiée par Jak2^{V617F}.**

L'analyse des mégacaryocytes a révélé des modifications phénotypiques induites par Srsf2^{P95H} dans le contexte d'une mutation Jak2^{V617F}. Dans un premier temps, ni l'augmentation du nombre de mégacaryocytes dans la moelle, ni la thrombocytose périphérique induites par Jak2^{V617F} ne sont corrigées par Srsf2^{P95H}. Cependant, la mutation Srsf2^{P95H} provoque dès les premières semaines une diminution de la taille des mégacaryocytes et de l'hyperploïdisation induite par Jak2^{V617F} tandis que l'expression du récepteur c-Mpl au niveau de leur membrane, qui est typiquement diminuée dans les

cellules $Jak2^{V617F}$, est partiellement restaurée. A des temps plus tardifs, le nombre de plaquettes dans le sang se normalise et le nombre de mégacaryocytes diminue dans la moelle des souris $Jak2^{V617F}$ du fait du développement d'une fibrose médullaire tandis que le chiffre des plaquettes reste élevé ainsi que le nombre de mégacaryocytes lorsque la mutation $Srsf2^{P95H}$ est associée puisque la myélofibrose est très retardée.

L'induction d'altérations phénotypiques des mégacaryocytes sous l'effet de la mutation de $Srsf2^{P95H}$ dans un contexte de mutation $Jak2^{V617F}$ pourrait être validé en répétant ces travaux dans un modèle *Pf4-Cre* (tandis qu'un modèle *LysM-Cre* permettrait de vérifier le peu d'impact de la mutation $Srsf2^{P95H}$ sur le phénotype monocytaire des cellules $Jak2^{V617F}$). L'impact de la combinaison de ces mutations sur le développement de la myélofibrose serait cependant difficile à étudier dans ces modèles. Dans un système *Pf4-Cre*, le transgène n'est exprimé que dans une partie des CSH et la fibrose induite par $Jak2^{V617F}$ est tardive par rapport à d'autres systèmes d'expression du transgène comme le système *Scf-Cre* que nous avons utilisé.^{239,240}

Enfin, nous avons tenté d'étudier les interactions entre mégacaryocytes et cellules effectrices de la fibrose : cellules stromales mésenchymateuses exprimant le facteur de transcription Gli1 (Gli1+) ou le récepteur de la Leptine (Lepr+) et leur progénie fibrosante, les myofibroblastes. Pour cela, nous avons réalisé un séquençage de l'ARN des cellules Lin⁻ triées et réalisé une analyse bio-informatique par déconvolution mais ces expériences n'ont pas généré de résultat suffisamment clair et une approche de séquençage d'ARN à l'échelle unicellulaire serait préférable pour explorer cet aspect.

- La mutation de *Srsf2* affecte la signalisation intracellulaire dans les mégacaryocytes

L'analyse comparative de notre modèle murin $Jak2^{V617F}$ $Srsf2^{P95H}$ ayant révélé des modifications phénotypiques des mégacaryocytes (diminution de l'hyperploïdie, augmentation de l'expression de c-Mpl à la membrane) et un ralentissement du développement de la fibrose médullaire induite par $Jak2^{V617F}$, nous avons évoqué une altération de la signalisation intracellulaire induite par $Jak2^{V617F}$. Cette signalisation joue un rôle central dans le développement d'un NMP et la maturation mégacaryocytaire dépend en grande partie de la signalisation de la TPO par l'intermédiaire de son récepteur MPL stabilisé à la membrane et de la kinase JAK2. Nous avons donc étudié les voies de signalisation en aval de MPL que sont la phosphorylation de JAK2 et des facteurs de transcription de la famille STAT.

Nous avons utilisé différentes approches, avec plus ou moins de succès, pour étudier l'impact de $Srsf2^{P95H}$ sur la signalisation Jak2/Stat3-5. Nous avons tout d'abord généré in vitro une lignée leucémique (UT-7) dans laquelle la mutation hétérozygote P95H de *Srsf2* a été introduite par technologie Crispr-Cas9. Cette lignée a été infectée par un rétrovirus exprimant $Jak2^{V617F}$ (ou $Jak2^{WT}$). Une dérive génétique a été observée avec la perte rapide de l'expression de la version mutée de *Srsf2*, phénomène déjà observé dans d'autres systèmes (iPS) et reflétant la faible tolérance de cette mutation par les cellules en dehors d'un contexte épistatique induit par certains événements génétiques ou épigénétiques ou peut être par les effets vieillissement cellulaire (données non montrées).

Nous avons aussi étudié l'expression des formes phosphorylées ou non des protéines JAK2 et de plusieurs protéines STAT (STAT1, STAT3, STAT5) par immuno-empreinte dans des cellules Lin⁻ de souris. Avec les réserves nécessaires du fait des limites de sensibilité de la technique, nous n'avons pas observé de différence significative entre les cellules $Jak2^{V617F}$ et $Jak2^{V617F}/Srsf2^{P95H}$ (données non montrées). La même étude (sur des cellules Lin⁻) a été réalisée en cytométrie en flux (« PhosphoFlow »)

en focalisant notre analyse sur les cellules CD41+ CD42d+ mais, là encore, l'hétérogénéité des résultats et des difficultés de compensation ne nous ont pas permis de conclure.

Afin d'éviter les problèmes de compensation rencontrés en cytométrie de flux, nous avons utilisé une approche par cytométrie de masse après marquage intra-cellulaire des cellules Lin⁻. Au-delà des variations inter-individuelles, nous avons observé une diminution de l'intensité maximale du signal P-STAT5 dans le lignage mégacaryocytaire (MK, MKP) et dans les progéniteurs, sans différence d'intensité de P-STAT3, tandis que P-STAT1 n'est détecté qu'à un niveau très faible.

Du fait des difficultés rencontrées pour explorer de manière convaincante la signalisation intracellulaire dans les cellules d'intérêt qui pourraient être le fait d'altérations minimales mais suffisantes pour modifier le phénotype cellulaire à moyen terme, nous avons évalué l'impact de la mutation *Srsf2*^{P95H} dans un contexte d'hyper-activation de la voie Tpo/Mpl induite chez la souris par la molécule mimant la TPO, le romiplostim, administrée à très forte dose. Dans ces conditions, la mutation *Srsf2*^{P95H} réduit sans ambiguïté la production plaquettaire et la fibrose médullaire induite. Ce résultat soutient l'hypothèse d'un impact négatif de la forme mutée de *Srsf2* sur la signalisation TPO/MPL impliquant Jak2. Il aurait été intéressant de confirmer l'impact de la mutation sur l'activation de Stat5 dans les cellules progénitrices et les mégacaryocytes dans ce modèle.

En accord avec cette observation, l'expression génique étudiée par séquençage d'ARN dans les mégacaryocytes triés confirme la régulation négative de plusieurs voies de signalisation intracellulaires (dont IL-2 / Stat5 et IL-6 / Stat3) des cellules *Jak2*^{V617F} / *Srsf2*^{P95H} par rapport aux cellules *Jak2*^{V617F}. Il est intéressant d'observer que, au-delà des voies de signalisation impliquant les facteurs STAT, la mutation de *Srsf2* affecte plusieurs autres voies de signalisation intracellulaire.

- **La mutation de *Srsf2* affecte l'épissage de l'exon 14 de *Jak2***

Afin d'explorer le mécanisme à l'origine d'une réduction de la signalisation intracellulaire impliquant la voie Jak2/Stat, modeste mais suffisante pour modifier le phénotype mégacaryocytaire et retarder l'installation de la fibrose médullaire, nous avons étudié les variations d'épissage des pré-ARNm induites par la protéine *Srsf2* mutée dans les mégacaryocytes murins exprimant ou non *Jak2* muté. Cette analyse bio-informatique a confirmé que la mutation *Srsf2*^{P95H} modifie globalement l'épissage en favorisant les sauts d'exons avec reconnaissance préférentielle des motifs CCNG au détriment des motifs GGNG. En s'intéressant aux ARNm des gènes de la voie Jak / Stat, nous avons détecté la modification de l'épissage de plusieurs gènes dont les protéines sont impliquées dans la signalisation Jak/Stat, notamment *Cish*, *Pias2*, *Pim1*, *Ptpn1*, *Stat5a* et *Jak2*. En revanche, ces données ne nous ont pas permis de confirmer les anomalies d'épissage de *Mpl* rapportées par d'autres auteurs.¹⁶⁴ Des variations de l'épissage de *CSF3R* induites par une mutation de SRSF2 ont été décrites, ces variations étant responsables d'une signalisation JAK/STAT défectueuse.¹⁶² Nous avons pu retrouver des variations d'épissage de *Csf3r* induite par *Srsf2*^{P95H} mais, les mégacaryocytes n'exprimant classiquement pas ce récepteur, les conséquences biologiques de cet épissage alternatif ne nous ont pas semblé pertinentes.

Nous avons focalisé notre attention sur *Jak2* dont l'exon 14 (contenant V617F chez la souris et l'homme) semblaient différemment épissés avec augmentation minimale mais significative du pourcentage d'ARNm avec perte des exons 13 et/ou 14. Ces variants d'épissage de *Jak2* sont minoritaires chez les souris *Srsf2*^{WT} mais leur expression augmente en cas de mutation *Srsf2*^{P95H}.

Afin de valider l'augmentation de l'expression de ce variant de l'ARNm de *Jak2* sans exon 14 dans le modèle murin, nous avons utilisé une technique de RT-QPCR dans de nouveaux échantillons de mégacaryocytes murins. Nous avons ensuite validé cette observation chez l'homme en utilisant des granulocytes sanguins de patients atteints de myélofibrose $JAK2^{V617F}$ avec mutation *SRSF2*. Le gène *JAK2*, situé sur le chromosome 9 chez l'homme, est composé de 25 exons et les variations d'épissage de *JAK2* avec perte de l'exon 14 ont déjà été décrites chez l'homme. Ainsi, Ma W. et al ont montré en 2009 la présence de ce variant chez 2 patients NMP en séquençant l'ARN de *JAK2*. Cette anomalie n'était pas retrouvée dans l'ADN génomique, suggérant un épissage alternatif.²⁷⁴ En 2010, la même équipe montrait que 15% des patients atteints de NMP présentaient des transcrits *JAK2* avec perte de l'exon 14, qu'ils aient une mutation $JAK2^{V617F}$ ou non, tandis qu'aucun sujet contrôle ne présentait cette anomalie.²⁷⁵ Chez ces patients, l'expression du variant sans exon 14 représentait une moyenne de 12% des transcrits *JAK2* (4-33%). Dans cette même étude, les auteurs montraient également qu'une protéine *JAK2* tronquée était synthétisée, témoignant d'un potentiel impact fonctionnel de ce variant d'épissage. Une autre équipe, en analysant l'ARN des granulocytes de patients NMP et contrôle, montraient que les ARNm avec délétion de l'exon 14 représentaient moins de 1% des transcrits *JAK2* mais que l'expression de ce transcrite était corrélée à la présence d'une mutation $JAK2^{V617F}$ et à la charge allélique $JAK2^{V617F}$.²⁷⁶ L'étude déterminait également, par analyse bio-informatique, que la mutation V617F de *JAK2* induit la création d'un motif de reconnaissance pour la protéine SC35, renommée par la suite *SRSF2*. La création d'un motif de reconnaissance de *SRSF2* induit par la mutation V617F de *JAK2* a également été retrouvée par une autre équipe en utilisant différents modèles de lignées cellulaires.²⁷⁷ Dans cette dernière étude, il n'était pas montré d'impact sur l'épissage de l'exon 14 de *JAK2* induit par la mutation V617F (en l'absence de mutation de *SRSF2*). L'ensemble de ces données confortent nos résultats sur le rôle d'une mutation *SRSF2* dans la survenue d'anomalie de l'épissage de *JAK2*, plus spécifiquement en cas de mutation $JAK2^{V617F}$, dans les cellules granuleuses et mégacaryocytaires, avec expression plus importante d'un ARNm sans exon 14 aboutissant à une protéine tronquée. Notre travail montre une association probable entre mutation de *SRSF2* et expression de ce variant d'épissage de *JAK2*. Toutefois, nous ne pouvons conclure à une association exclusive, ce variant pouvant être probablement généré en l'absence d'une mutation de *SRSF2*. Afin de s'assurer de la spécificité de cette association, il aurait été utile d'évaluer la présence de ce variant sur une large cohorte de patients atteint de NMP $JAK2^{V617F}$, avec et sans mutation de *SRSF2* (voire avec et sans mutation d'un gène de l'épissage tels *U2AF1* ou *SF3B1*). Toutefois, la difficulté d'accès à des échantillons de patients présentant le génotype $JAK2^{V617F}$ *SRSF2*^{P95H} ne nous a pas permis de réaliser cette évaluation.

L'impact fonctionnel d'une perte de l'exon 14 de *JAK2* a déjà été étudié par d'autres équipes. Il est établi depuis plusieurs années que la perte d'une partie du domaine pseudokinase JH2 (exons 13, 14 et 15 de *JAK2*) est responsable d'une hyperactivation constitutive de STAT5 mais d'une absence de réponse à la stimulation par les cytokines.²⁷⁸ Aucune comparaison à la signalisation induite par la mutation V617F de *JAK2* n'avait été réalisée, la mutation n'étant pas décrite à cette date. En 2009, une simulation bio-informatique de l'impact d'une perte de l'exon 14 de *JAK2* (perte des acides aminés 593 à 622 dans le domaine pseudokinase) suggérait également une activation constitutive de *JAK2*, sans pouvoir en préciser l'intensité ou la comparer à celle induite par $JAK2^{V617F}$.²⁷⁹ Toutefois, l'épissage alternatif responsable de l'exclusion de l'exon 14 est responsable d'un décalage de lecture aboutissant à la formation d'un codon stop. Ainsi, la protéine tronquée issue de l'épissage alternatif avec exclusion de l'exon 14 aboutit à une protéine tronquée sans exon 14 mais également sans tous les exons en aval.

Cette protéine se retrouverait donc tronquée de l'ensemble du domaine kinase et de la quasi-totalité du domaine pseudokinase tout en conservant les domaines FERM de liaison aux récepteurs de cytokines. Cette protéine tronquée jouerait alors un rôle dominant négatif puisqu'elle serait fixée au récepteurs de cytokine sans être capable d'une activité de phosphorylation et donc de transduction du signal. Nous émettons donc l'hypothèse que ce variant d'épissage de *Jak2* sans exon 14, induit par la mutation P95H de *Srsf2*, diminue l'intensité de la signalisation Jak2/Stat5 par rapport à celle induite par Jak2^{V617F}. Afin de le confirmer, il serait intéressant, et relativement aisé, de modéliser la perte de l'exon 14 de *JAK2* dans une lignée cellulaire JAK2^{V617F} ou JAK2^{WT} et d'étudier par western blot la phosphorylation de JAK2, STAT3 et STAT5 (avec et sans cytokine). Enfin, nous avons pu observer un épissage préférentiel avec exclusion de l'exon 13 en cas de mutation P95H de *Srsf2*. Nous n'avons pas tenté de vérifier cet épissage alternatif sur d'autres échantillons, mais cette anomalie pourrait également jouer un rôle cumulatif dans la diminution de l'hypersignalisation Jak2/Stat5 induite par Jak2^{V617F} en cas de mutation de *Srsf2*.

- Autres questions et perspectives...

L'étude de notre modèle a permis de générer de nombreux résultats et d'autres questions que celles suggérées ci-dessus demeurent. En particulier, l'analyse transcriptomique des mégacaryocytes triés a permis d'observer une régulation à la baisse des voies de signalisation impliquant Jak2. Toutefois, la 1^{ère} voie biologique dérégulée demeure la voie du TNF α via NF- κ B. En effet, une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie du TNF α via NF- κ B est observée chez les souris Jak2^{V617F}. Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature puisqu'une activation extrinsèque (induite par les cytokines tels que le TNF α) et constitutive de cette voie est observée dans différents sous-types cellulaires dans les NMP.²⁸⁰ L'intensité d'activation de la voie NF- κ B est d'ailleurs corrélée à la présence (et au développement) de la fibrose médullaire et à l'hyperproduction de cytokines pro-inflammatoires observée en cas de MF.^{220,281,282} Il n'est donc pas étonnant d'observer une diminution de l'expression des gènes de cette voie en présence associée de *Srsf2*^{P95H}, étant donné son impact négatif sur le développement de la fibrose médullaire induite par Jak2^{V617F}. Toutefois, concernant le rôle de *Srsf2*^{P95H} sur la voie NF- κ B, nos résultats semblent en contradiction avec les données de la littérature puisqu'une hyperactivation de la signalisation NF- κ B a été décrite dans des lignées et des échantillons de cellules mononuclées de patients présentant une mutation de *SRSF2*. Cette hyperactivation serait attribuée à un épissage alternatif par saut d'exon de *CASP8* (un gène activateur de la voie NF- κ B) à l'origine de la génération d'une isoforme protéique tronquée.¹⁶⁴ Il n'existe pas d'explication claire à cette discordance mais sachant que notre analyse transcriptomique a été réalisée sur des mégacaryocytes, l'effet de la mutation de *Srsf2* pourrait avoir un rôle différent sur la voie du TNF α en fonction du sous-type cellulaire étudié. Autre élément important, nous avons pu montrer que notre modèle murin Jak2^{V617F} présentait un taux plasmatique élevé de TNF α , qui était diminué en cas d'association à *Srsf2*^{P95H}. Ainsi, nos résultats d'analyse transcriptomique seraient plutôt le reflet d'une moindre stimulation par le TNF α sur les mégacaryocytes que d'une moindre activation constitutive de la voie NF- κ B. Sachant que le TNF α est majoritairement produit par les monocytes, il serait intéressant d'évaluer l'impact d'une mutation de *Srsf2* sur la capacité de production de TNF α par les monocytes.

L'analyse transcriptomique des mégacaryocytes a également révélé que la voie c-Myc est dérégulée, cette fois-ci à la hausse, par l'association de *Srsf2*^{P95H} avec Jak2^{V617F}. *Myc* est un facteur de transcription impliqué dans la prolifération cellulaire et la différenciation, possédant des propriétés

pro-tumorigènes. L'activité de Myc est dépendante de certaines protéines du complexe d'épissage (dont SF3B1 et U2AF1) tandis qu'une altération des processus d'épissage permet de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses dépendantes de Myc.²⁸³ A l'inverse, il a été montré que Myc est impliqué dans la régulation appropriée des processus d'épissage.²⁸⁴ Il n'est donc pas surprenant que cette voie biologique soit dérégulée en cas de mutation *Srsf2*^{P95H}. Concernant son rôle dans la mégacaryopoïèse, il a été montré que les souris avec inactivation de *c-Myc* présentent une thrombocytose associée à des mégacaryocytes plus petits avec ploïdie diminuée.²⁸⁵ Il est donc plutôt déroutant d'observer dans notre modèle une augmentation de l'expression des gènes de la voie Myc.

L'autre versant partiellement exploité de l'étude transcriptomique des mégacaryocytes concerne l'analyse des variants d'épissage induit par *Srsf2*^{P95H}. En effet, notre analyse de l'épissage s'est clairement focalisé sur les gènes de la voie JAK2/STAT au vu de nos résultats phénotypiques. Toutefois, une analyse approfondie des gènes d'autres voies biologiques (voie TNF α , voie MYC) aurait son intérêt.

Enfin, de manière plus pratique, on peut se poser la question de l'implication clinique et thérapeutique de nos résultats. Les inhibiteurs de JAK sont largement utilisés chez les patients atteints de MF avec signes généraux et/ou splénomégalie symptomatique ou de PV en échec ou intolérance à l'hydroxyurée. Notre étude montre que *Srsf2*^{P95H} favorise la synthèse d'un transcrite de *Jak2*^{V617F} sans exon 14, i.e. sans l'exon comportant la mutation V617F. Il est prédit que cette anomalie induit une hyperactivation constitutive persistante de JAK2. Les conséquences biologiques d'un traitement par inhibiteur de JAK2 sur cette protéine tronquée ne sont pas connues et il aurait été intéressant de l'étudier sur notre modèle murin. Toutefois, deux études ont montré que la présence d'une mutation de *SRSF2* n'avait pas d'impact sur la réponse au traitement par inhibiteur JAK2 en cas de MF.^{286,287} Plus récemment, une étude randomisant l'utilisation de ruxolitinib chez des patients atteints de TE montrait que ce traitement ne permettait pas de diminuer le risque de transformation des patients présentant une mutation d'un gène de l'épissage.²⁸⁸ Ces données suggèrent que l'inhibition de JAK2 n'a pas d'impact sur l'évolution naturelle d'un clone *JAK2*^{V617F} *SRSF2*^{P95H}. On peut donc imaginer que l'effet du ruxolitinib sur la protéine JAK2 tronquée n'est pas suffisante.

L'IFN α est devenue depuis plusieurs années un traitement de choix des TE et PV. Son efficacité est en lien avec une mise en cycle préférentielle des CSH *Jak2*^{V617F} qui permet leur différenciation, voire leur éradication.^{289,290} La présence d'une mutation de haut risque, incluant les mutations de *SRSF2*, est associée à une diminution des taux de réponse à l'IFN chez les patients atteints de MF. Toutefois, ces études se heurtent, une fois de plus, aux faibles effectifs de patients porteurs d'une mutation de *SRSF2* et ne permettent pas de tirer des conclusions formelles.^{291,292} Au vu de nos résultats en faveur d'un effet protecteur de *Srsf2*^{P95H} sur les CSH *Jak2*^{V617F} en transplantations sériées, nous avons émis l'hypothèse que la présence de *Srsf2*^{P95H} limiterait la mise en cycle des CSH et que l'IFN aurait une efficacité plus limitée sur les CSH double mutante, favorisant ainsi leur avantage compétitif face aux CSH *Jak2*^{V617F} simple mutante. Si notre hypothèse s'avérait exacte, il pourrait être nécessaire de dépister la présence d'une mutation de *SRSF2* chez les patients atteints de NMP avant d'instaurer un traitement par IFN, de manière à ne pas favoriser l'émergence du sous-clone porteur des 2 mutations (et potentiellement augmenter le risque de transformation en LAM). Pour tester notre hypothèse, nous avons réalisé une expérience de greffe compétitive de moelle *Jak2*^{V617F} et *Jak2*^{V617F} *Srsf2*^{P95H} puis soumis les souris greffées à un traitement quotidien par IFN α par voie sous-cutanée pendant 10 semaines. Malheureusement, cette étude lourde sur le plan technique n'a pu être réalisée de manière

optimale car débutée en pleine pandémie mondiale de Covid-19 et cette expérience n'a pu être réalisée depuis.

Enfin, le processus d'épissage des ARNm est dérégulé en cas de MF, ceci étant en lien avec les mutations de gènes de l'épissage plus fréquentes.²⁸² Cette dérégulation des processus d'épissage induite par ces mutations devient possiblement un moyen d'éradiquer plus spécifiquement les cellules mutantes. Les données pré-cliniques obtenues en inhibant le processus d'épissage par ciblage de l'interaction SF3B-ARNm avec des composés chimiques tels que le H3B-8800 sont très encourageantes même si les résultats d'étude de phase I sont plutôt décevantes.²⁹³ Mais de manière plus globale, l'étude des anomalies de l'épissage dans les NMP est prometteuse puisqu'il a récemment été montré que des protéines impliquées dans le complexe de l'épissage (en particulier YBX1) sont la cible de la protéine JAK2 mutante et que leur inhibition permettrait d'éradiquer le clone hématopoïétique de NMP.²⁹⁴ Des données encore plus prometteuses concernent PRMT5, une protéine avec activité arginine méthyltransferase. En effet, cette protéine est surexprimée dans des cellules primaires de patients atteints de NMP JAK2^{V617F} et son inhibition permet de limiter in vitro la prolifération de ces cellules et d'améliorer in vivo sur modèle murin les paramètres hématologiques.²⁹⁵ Mais l'inhibition de PRMT5 altère également les processus d'épissage et cible plus spécifiquement des cellules porteuses d'une mutation de *SRSF2*.²⁹⁶ L'inhibition de PRMT5 permettrait alors de cibler préférentiellement les clones JAK2^{V617F} porteurs d'une mutation de *SRSF2* associée.

Références bibliographiques

1. Laurenti E, Göttgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. 2018;553(7689):418-426. doi:10.1038/nature25022
2. Christensen JL, Weissman IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(25):14541-14546. doi:10.1073/pnas.261562798
3. Kiel MJ, Yilmaz ÖH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005;121(7):1109-1121. doi:10.1016/j.cell.2005.05.026
4. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):635-645. doi:10.1016/j.stem.2007.10.001
5. Kent DG, Copley MR, Benz C, et al. Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. *Blood*. 2009;113(25):6342-6350. doi:10.1182/blood-2008-12-192054
6. Oguro H, Ding L, Morrison SJ. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*. 2013;13(1):102-116. doi:10.1016/j.stem.2013.05.014
7. Yamamoto R, Morita Y, Ooehara J, et al. Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*. 2013;154(5):1112-1126. doi:10.1016/j.cell.2013.08.007
8. Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature*. 2013;502(7470):232-236. doi:10.1038/nature12495
9. Carrelha J, Meng Y, Kettle LM, et al. Hierarchically related lineage-restricted fates of multipotent haematopoietic stem cells. *Nature*. 2018;554(7690):106-111. doi:10.1038/nature25455
10. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019;20(5):303-320. doi:10.1038/s41580-019-0103-9
11. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, IL W. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 2000;404(6774):193-197.
12. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, et al. Identification of Flt3+ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential: A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*. 2005;121(2):295-306. doi:10.1016/j.cell.2005.02.013
13. Arinobu Y, Mizuno S ichi, Chong Y, et al. Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell*. 2007;1(4):416-427. doi:10.1016/j.stem.2007.07.004
14. Lai AY, Kondo M. Asymmetrical lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med*. 2006;203(8):1867-1873. doi:10.1084/jem.20060697
15. Yoshida T, Ng YS, C. Z-PJ, K. G. Early hemopoietic lineage restrictions directed by Ikaros Toshimi. *Nat Immunol*. 2009;9(18):1841-1850. doi:10.1016/j.jacc.2007.01.076.
16. Pietras EM, Reynaud D, Kang YA, et al. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell*. 2015;17(1):35-46. doi:10.1016/j.stem.2015.05.003
17. Paul F, Arkin Y, Giladi A, et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell*. 2015;163(7):1663-1677. doi:10.1016/j.cell.2015.11.013
18. Nestorowa S, Hamey FK, Pijuan Sala B, et al. A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood*. 2016;128(8):e20-e31. doi:10.1182/blood-2016-05-716480

19. Wheat JC, Sella Y, Willcockson M, et al. Single-molecule imaging of transcription dynamics in somatic stem cells. *Nature*. 2020;583(7816):431-436. doi:10.1038/s41586-020-2432-4
20. Hoppe PS, Schwarzfischer M, Loeffler D, et al. Early myeloid lineage choice is not initiated by random PU.1 to GATA1 protein ratios. *Nature*. 2016;535(7611):299-302. doi:10.1038/nature18320
21. Izzo F, Lee SC, Poran A, et al. DNA methylation disruption reshapes the hematopoietic differentiation landscape. *Nat Genet*. 2020;52(4):378-387. doi:10.1038/s41588-020-0595-4
22. Psaila B, Mead AJ. Single-cell approaches reveal novel cellular pathways for megakaryocyte and erythroid differentiation. *Blood*. 2019;133(13):1427-1435. doi:10.1182/blood-2018-11-835371
23. Rodriguez-Fraticelli AE, Wolock SL, Weinreb CS, et al. Clonal analysis of lineage fate in native haematopoiesis. *Nature*. 2018;553(7687):212-216. doi:10.1038/nature25168
24. Roch A, Trachsel V, Lutolf MP. Brief Report: Single-Cell Analysis Reveals Cell Division-Independent Emergence of Megakaryocytes from Phenotypic Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*. 2015;33(10). doi:10.1002/stem.2106
25. Haas S, Hansson J, Klimmeck D, et al. Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell Stem Cell*. 2015;17(4):422-434. doi:10.1016/j.stem.2015.07.007
26. Gekas C, Graf T. CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*. 2013;121(22):4463-4472. doi:10.1182/blood-2012-09-457929
27. Grover A, Sanjuan-Pla A, Thongjuea S, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. *Nat Commun*. 2016;7. doi:10.1038/ncomms11075
28. Psaila B, Barkas N, Iskander D, et al. Single-cell profiling of human megakaryocyte-erythroid progenitors identifies distinct megakaryocyte and erythroid differentiation pathways. *Genome Biol*. 2016;17(1):1-19. doi:10.1186/s13059-016-0939-7
29. Miyawaki K, Iwasaki H, Jiromaru T, et al. Identification of unipotent megakaryocyte progenitors in human hematopoiesis. *Blood*. 2017;129(25):3332-3343. doi:10.1182/blood-2016-09-741611
30. Wendling F, Maraskovsky E, Debili N, et al. C-Mpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature*. 1994;369(6481). doi:10.1038/369571a0
31. Murone M, Carpenter DA, De Sauvage FJ. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells*. 1998;16(1):1-6. doi:10.1002/stem.160001
32. Villeval JL, Cohen-Solal K, Tulliez M, et al. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. *Blood*. 1997;90(11):4369-4383. doi:10.1182/blood.v90.11.4369
33. Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest*. 2002;110(3):389-394. doi:10.1172/JCI0215430
34. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. Thrombopoietin/MPL Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Interaction with the Osteoblastic Niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-697. doi:10.1016/j.stem.2007.10.020
35. Nichol JL, Hokom MM, Homkohl A, et al. Megakaryocyte Growth and Development Factor. *Development*. 1995;95(June):2973-2978.
36. Grozovsky R, Begonja AJ, Liu K, et al. The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling. *Nat Med*. 2015;21(1):47-54. doi:10.1038/nm.3770
37. McIntosh B, Kaushansky K. Transcriptional regulation of bone marrow thrombopoietin by platelet proteins. *Exp Hematol*. 2008;36(7):799-806. doi:10.1016/j.exphem.2008.02.012
38. Drachman JG, Griffin JD, Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem*. 1995;270(10):4979-4982. doi:10.1074/jbc.270.10.4979

39. Geddis AE, Fox NE, Kaushansky K. Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Necessary but Not Sufficient for Thrombopoietin-induced Proliferation in Engineered Mpl-bearing Cell Lines as Well as in Primary Megakaryocytic Progenitors. *J Biol Chem*. 2001;276(37):34473-34479. doi:10.1074/jbc.M105178200
40. Rouyez MC, Boucheron C, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I, Porteu F. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):4991-5000. doi:10.1128/mcb.17.9.4991
41. Rojnuckarin P, Drachman JG, Kaushansky K. Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: Role in endomitosis. *Blood*. 1999;94(4):1273-1282. doi:10.1182/blood.v94.4.1273.416k04_1273_1282
42. Raslova H, Baccini V, Loussaief L, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) regulates both proliferation of megakaryocyte progenitors and late stages of megakaryocyte differentiation. *Blood*. 2006;107(6):2303-2310. doi:10.1182/blood-2005-07-3005
43. Schulze H, Ballmaier M, Welte K, Germeshausen M. Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. *Exp Hematol*. 2000;28(3):294-304. doi:10.1016/S0301-472X(99)00154-X
44. Miyakawa Y, Oda A, Druker BJ, et al. Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood*. 1996;87(2):439-446. doi:10.1182/blood.v87.2.439.bloodjournal872439
45. Sattler M, Durstin MA, Frank DA, et al. The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp Hematol*. 1995.
46. Ezumi Y, Takayama H, Okuma M. Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro. *FEBS Lett*. 1995. doi:10.1016/0014-5793(95)01072-M
47. Kaosheng L, Jiang J, Donaghy R, et al. CBL family E3 ubiquitin ligases control JAK2 ubiquitination and stability in hematopoietic stem cells and myeloid malignancies. *Genes Dev*. 2017;31(10):1007-1023. doi:10.1101/gad.297135.117
48. Saur SJ, Sangkhae V, Geddis AE, Kaushansky K, Hitchcock IS. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood*. 2010;115(6):1254-1263. doi:10.1182/blood-2009-06-227033
49. Märklin M, Tandler C, Kopp HG, et al. C-Cbl regulates c-MPL receptor trafficking and its internalization. *J Cell Mol Med*. 2020;24(21):12491-12503. doi:10.1111/jcmm.15785
50. Myers MP, Andersen JN, Cheng A, et al. TYK2 and JAK2 Are Substrates of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *J Biol Chem*. 2001;276(51):47771-47774. doi:10.1074/jbc.C100583200
51. Irie-Sasaki J, Sasaki T, Matsumoto W, et al. CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*. 2001;409(6818):349-354. doi:10.1038/35053086
52. Wang Q, Miyakawa Y, Fox N, Kaushansky K. Interferon- α directly represses megakaryopoiesis by inhibiting thrombopoietin-induced signaling through induction of SOCS-1. *Blood*. 2000;96(6):2093-2099. doi:10.1182/blood.v96.6.2093.h8002093_2093_2099
53. Tong W, Lodish HF. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med*. 2004;200(5):569-580. doi:10.1084/jem.20040762
54. Li Y, Jin C, Bai H, et al. Human NOTCH4 is a key target of RUNX1 in megakaryocytic differentiation. *Blood*. 2018;131(2):191-201. doi:10.1182/blood-2017-04-780379
55. Chen S, Hu M, Shen M, et al. IGF-1 facilitates thrombopoiesis primarily through Akt activation. *Blood*. 2018;132(2):210-222. doi:10.1182/blood-2018-01-825927
56. Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, et al. IL-1 α induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *J Cell Biol*. 2015;209(3):453-466. doi:10.1083/jcb.201410052
57. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the

- transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994;371(6494):221-226. doi:10.1038/371221a0
58. Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol*. 2000;28(12):1423-1431. doi:10.1016/S0301-472X(00)00553-1
 59. Ichikawa M, Asai T, Chiba S, Kurokawa M, Ogawa S. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell Cycle*. 2004;3(6):720-722. doi:10.4161/cc.3.6.951
 60. Kuvardina ON, Herglotz J, Kolodziej S, et al. RUNX1 represses the erythroid gene expression program during megakaryocytic differentiation. *Blood*. 2015;125(23):3570-3579. doi:10.1182/blood-2014-11-610519
 61. Athanasiou M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L, Blair DG. FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia*. 2000;14(3):439-445. doi:10.1038/sj.leu.2401689
 62. Martin F, Prandini MH, Thevenon D, Marguerie G, Uzan G. The transcription factor GATA-1 regulates the promoter activity of the platelet glycoprotein IIb gene. *J Biol Chem*. 1993;268(29):21606-21612. doi:10.1016/s0021-9258(20)80584-5
 63. Lordier L, Bluteau D, Jalil A, et al. RUNX1-induced silencing of non-muscle myosin heavy chain IIB contributes to megakaryocyte polyploidization. *Nat Commun*. 2012;3. doi:10.1038/ncomms1704
 64. Jalagadugula G, Mao G, Kaur G, Goldfinger LE, Dhanasekaran DN, Rao AK. Regulation of platelet myosin light chain (MYL9) by RUNX1: Implications for thrombocytopenia and platelet dysfunction in RUNX1 haplodeficiency. *Blood*. 2010;116(26):6037-6045. doi:10.1182/blood-2010-06-289850
 65. Bastian LS, Kwiatkowski BA, Breininger J, Danner S, Roth G. Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1. *Blood*. 1999;93(8):2637-2644. doi:10.1182/blood.v93.8.2637.408k20_2637_2644
 66. Lecine P, Villeval JL, Vyas P, Swencki B, Xu Y, Shivdasani RA. Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes. *Blood*. 1998;92(5):1608-1616. doi:10.1182/blood.v92.5.1608
 67. De Botton S, Sabri S, Daugas E, et al. Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes. *Blood*. 2002;100(4):1310-1317. doi:10.1182/blood-2002-03-0686
 68. Bruns I, Lucas D, Pinho S, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014;20(11):1315-1320. doi:10.1038/nm.3707
 69. Zhao M, Perry JM, Marshall H, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2014;20(11):1321-1326. doi:10.1038/nm.3706
 70. Kacena MA, Shivdasani RA, Wilson K, et al. Megakaryocyte-osteoblast interaction revealed in mice deficient in transcription factors GATA-1 and NF-E2. *J Bone Miner Res*. 2004;19(4):652-660. doi:10.1359/JBMR.0301254
 71. Olson TS, Caselli A, Otsuru S, et al. Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood*. 2013;121(6):5238-5249. doi:10.1182/blood-2012-10-463414
 72. Malara A, Currao M, Gruppi C, et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. *Stem Cells*. 2014;32(4). doi:10.1002/stem.1626
 73. Cazzola M. Introduction to a review series: The 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood*. 2016;127(20):2361-2364. doi:10.1182/blood-2016-03-657379
 74. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390. doi:10.1182/blood-2016-01-643569

75. 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. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
76. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507-2513. doi:10.1182/blood-2014-05-579136
77. 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. doi:10.1182/blood-2011-02-339002
78. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(7):1062-1069. doi:10.1182/blood-2014-05-578435
79. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. *N Engl J Med*. 2004;350(2):114-124. doi:10.1056/nejmoa035572
80. Barbui T, Carobbio A, Rumi E, et al. To the editor: In contemporary patients with polycythemia vera, rates of thrombosis and risk factors delineate a new clinical epidemiology. *Blood*. Published online 2014. doi:10.1182/blood-2014-07-591610
81. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: Incidence and risk factors. *Blood*. 2010;115(4):778-782. doi:10.1182/blood-2009-08-238956
82. Cervantes F, Dupriez B, Passamonti F, et al. Improving survival trends in primary myelofibrosis: An international study. *J Clin Oncol*. 2012;30(24):2981-2987. doi:10.1200/JCO.2012.42.0240
83. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia Vera: Stem-Cell and Probable Clonal Origin of the Disease. *N Engl J Med*. 1976. doi:10.1056/nejm197610212951702
84. Fialkow PJ, Faguet GB, Jacobson RJ, Vaidya K, Murphy S. Evidence that essential thrombocythemia is a clonal disorder with origin in a multipotent stem cell. *Blood*. Published online 1981. doi:10.1182/blood.v58.5.916.916
85. Jamieson CHM, Gotlib J, Durocher JA, et al. The JAK2 V617F mutation occurs in hematopoietic stem cells in polycythemia vera and predisposes toward erythroid differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6224-6229. doi:10.1073/pnas.0601462103
86. Williams N, Lee J, Moore L, et al. Phylogenetic reconstruction of myeloproliferative neoplasm reveals very early origins and lifelong evolution. *bioRxiv*. Published online 2020. doi:10.1101/2020.11.09.374710
87. Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med*. 2014;211(11):2213-2230. doi:10.1084/jem.20131371
88. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(2):111-121. doi:10.1056/nejmoa1701719
89. Reynaud D, Pietras E, Barry-Holson K, et al. IL-6 Controls Leukemic Multipotent Progenitor Cell Fate and Contributes to Chronic Myelogenous Leukemia Development. *Cancer Cell*. 2011;20(5):661-673. doi:10.1016/j.ccr.2011.10.012
90. Welner RS, Amabile G, Bararia D, et al. Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia by Blocking Cytokine Alterations Found in Normal Stem and Progenitor Cells. *Cancer Cell*. 2015;27(5):671-681. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.004
91. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005. doi:10.1038/nature03546
92. Parganas E, Wang D, Stravopodis D, et al. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell*. 1998;93(3):385-395. doi:10.1016/S0092-8674(00)81167-8
93. Akada H, Akada S, Hutchison RE, Sakamoto K, Wagner KU, Mohi G. Critical role of Jak2 in the maintenance and function of adult hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 2014;32(7):1878-1889. doi:10.1002/stem.1711
94. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity

- protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 2011;18(9):971-976. doi:10.1038/nsmb.2099
95. Shan Y, Gnanasambandan K, Ungureanu D, et al. Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(7):579-584. doi:10.1038/nsmb.2849
 96. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(8):754-759. doi:10.1038/nsmb.2348
 97. Wernig G, Gonneville JR, Crowley BJ, et al. The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood*. 2008;111(7):3751-3759. doi:10.1182/blood-2007-07-102186
 98. Lu X, Levine R, Tong W, et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(52):18962-18967. doi:10.1073/pnas.0509714102
 99. Sangkhae V, Etheridge SL, Kaushansky K, Hitchcock IS. The thrombopoietin receptor, MPL, is critical for development of a JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2014;124(26):3956-3963. doi:10.1182/blood-2014-07-587238
 100. Pecquet C, Diaconu CC, Staerk J, et al. Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: Restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood*. 2012;119(20):4625-4635. doi:10.1182/blood-2011-08-372524
 101. Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 α from chromatin. *Nature*. 2009;461(7265):819-822. doi:10.1038/nature08448
 102. Liu F, Zhao X, Perna F, et al. JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell*. 2011;19(2):283-294. doi:10.1016/j.ccr.2010.12.020
 103. Shide K. The role of driver mutations in myeloproliferative neoplasms: insights from mouse models. *Int J Hematol*. 2020;111(2):206-216. doi:10.1007/s12185-019-02803-x
 104. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood*. 2006;108(5):1652-1660. doi:10.1182/blood-2006-02-002030
 105. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2006;107(11):4274-4281. doi:10.1182/blood-2005-12-4824
 106. 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. doi:10.1182/blood-2007-08-107748
 107. Shide K, Shimoda HK, Kumano T, et al. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. *Leukemia*. 2008;22(1):87-95. doi:10.1038/sj.leu.2405043
 108. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010;115(17):3589-3597. doi:10.1182/blood-2009-04-215848
 109. Marty C, Lacout C, Martin A, et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2 V617F in knock-in mice. *Blood*. 2010;116(5):783-787. doi:10.1182/blood-2009-12-257063
 110. Mullally A, Lane SW, Ball B, et al. Physiological Jak2V617F Expression Causes a Lethal Myeloproliferative Neoplasm with Differential Effects on Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cancer Cell*. 2010;17(6):584-596. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.015
 111. Li J, Spensberger D, Ahn JS, et al. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood*. 2010;116(9):1528-1538. doi:10.1182/blood-2009-12-259747

112. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. *Blood*. 2017;129(12):1607-1616. doi:10.1182/blood-2016-10-696005
113. Reinisch A, Thomas D, Corces MR, et al. A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells. *Nat Med*. 2016;22(7):812-821. doi:10.1038/nm.4103
114. Mullally A, Poveromo L, Schneider RK, Al-Shahrour F, Lane SW, Ebert BL. Distinct roles for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. *Blood*. 2012;120(1):166-172. doi:10.1182/blood-2012-01-402396
115. Bao EL, Nandakumar SK, Liao X, et al. Inherited Myeloproliferative Neoplasm Risk Affects Haematopoietic Stem Cells. *Nature*. 2020. doi:10.1038/s41586-020-2786-7
116. Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood*. 2013;122(8):1464-1477. doi:10.1182/blood-2013-04-498956
117. Xu M, Bruno E, Chao J, et al. The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2005;105(4):1699-1705. doi:10.1182/blood-2004-06-2485
118. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, et al. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118(24):6392-6398. doi:10.1182/blood-2011-04-348144
119. Heaton WL, Senina A V., Pomicter AD, et al. Autocrine Tnf signaling favors malignant cells in myelofibrosis in a Tnfr2-dependent fashion. *Leukemia*. 2018;32(11):2399-2411. doi:10.1038/s41375-018-0131-z
120. Zhan H, Ma Y, Lin CHS, Kaushansky K. JAK2 V617F -mutant megakaryocytes contribute to hematopoietic stem/progenitor cell expansion in a model of murine myeloproliferation. *Leukemia*. 2016;30(12):2332-2341. doi:10.1038/leu.2016.114
121. Zhang Y, Lin CHS, Kaushansky K, Zhan H. JAK2V617F Megakaryocytes Promote Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Expansion in Mice Through Thrombopoietin/MPL Signaling. *Stem Cells*. 2018;36(11):1676-1684. doi:10.1002/stem.2888
122. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129(6):667-679. doi:10.1182/blood-2016-10-695940
123. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30(3):229-236. doi:10.1016/S0301-472X(01)00789-5
124. Teofili L, Martini M, Cenci T, et al. Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood*. 2007;110(1):354-359. doi:10.1182/blood-2007-01-069237
125. Chen E, Beer PA, Godfrey AL, et al. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell*. 2010;18(5):524-535. doi:10.1016/j.ccr.2010.10.013
126. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468. doi:10.1056/nejmoa065202
127. Grisouard J, Shimizu T, Duek A, et al. Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. *Blood*. 2015;125(13):2131-2140. doi:10.1182/blood-2014-08-594572
128. Yan D, Hutchison RE, Mohi G. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. *Blood*. 2012;119(15):3539-3549. doi:10.1182/blood-2011-03-345215
129. Walz C, Ahmed W, Lazarides K, et al. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2 V617F in mice. *Blood*. 2012;119(15):3550-3560. doi:10.1182/blood-2011-12-397554
130. Duek A, Lundberg P, Shimizu T, et al. Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors

- erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood*. 2014;123(25):3943-3950. doi:10.1182/blood-2013-07-514208
131. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. 2006;107(5):1864-1871. doi:10.1182/blood-2005-06-2600
 132. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405. doi:10.1056/nejmoa1312542
 133. Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: Relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29(1):249-252. doi:10.1038/leu.2014.270
 134. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325-1335. doi:10.1182/blood-2015-11-681932
 135. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, et al. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov*. 2016;6(4):368-381. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-1434
 136. Pecquet C, Chachoua I, Roy A, et al. Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *Blood*. 2019;133(25):2669-2681. doi:10.1182/blood-2018-09-874578
 137. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2018;379(15):1416-1430. doi:10.1056/nejmoa1716614
 138. Delic S, Rose D, Kern W, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2016;175(3):419-426. doi:10.1111/bjh.14269
 139. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: Clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-1477. doi:10.1038/leu.2014.3
 140. Bartels S, Lehmann U, Büsche G, et al. SRSF2 and U2AF1 mutations in primary myelofibrosis are associated with JAK2 and MPL but not calreticulin mutation and may independently reoccur after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2015;29(1):253-255. doi:10.1038/leu.2014.277
 141. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372(7):601-612. doi:10.1056/nejmoa1412098
 142. Delhommeau F, Dupont S, Valle V Della, et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. *N Engl J Med*. Published online 2009. doi:10.1056/nejmoa0810069
 143. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(14):2220-2228. doi:10.1182/blood-2013-11-537167
 144. Kameda T, Shide K, Yamaji T, et al. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: Disease sustainer and disease accelerator. *Blood*. 2015;125(2):304-315. doi:10.1182/blood-2014-04-555508
 145. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2015;125(2):327-335. doi:10.1182/blood-2014-04-567024
 146. Nangalia J, Nice FL, Wedge DC, et al. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. *Haematologica*. 2015. doi:10.3324/haematol.2015.129510
 147. Jacquelin S, Straube J, Cooper L, et al. Jak2V617F and Dnmt3a loss cooperate to induce myelofibrosis through activated enhancer-driven inflammation. *Blood*. 2019;132(26):2707-

- 2722.
148. Mckenney AS, Thompson CB, Ross L, et al. JAK2 / IDH-mutant – driven myeloproliferative neoplasm is sensitive to combined targeted inhibition. *J Clin Invest*. 2018;(September):1-16.
 149. Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet*. 2010;42(8):722-726. doi:10.1038/ng.621
 150. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*. 2011;118(19):5227-5234. doi:10.1182/blood-2011-06-363424
 151. Yang Y, Akada H, Nath D, Hutchison RE, Mohi G. Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. *Blood*. 2016;127(26):3410-3423. doi:10.1182/blood-2015-11-679431
 152. Shimizu T, Kubovcakova L, Nienhold R, et al. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. *J Exp Med*. 2016;213(8):1479-1496. doi:10.1084/jem.20151136
 153. Sashida G, Wang C, Tomioka T, et al. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. *J Exp Med*. 2016;213(8):1459-1477. doi:10.1084/jem.20151121
 154. Ricci C, Spinelli O, Salmoiraghi S, Finazzi G, Carobbio A, Rambaldi A. ASXL1 mutations in primary and secondary myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2012. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08865.x
 155. Stein BL, Williams DM, O'Keefe C, et al. Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: Analysis of molecular genetics and clinical phenotypes. *Haematologica*. 2011;96(10):1462-1469. doi:10.3324/haematol.2011.045591
 156. Guo Y, Zhou Y, Yamatomo S, et al. ASXL1 alteration cooperates with JAK2V617F to accelerate myelofibrosis. *Leukemia*. 2019. doi:10.1038/s41375-018-0347-y
 157. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011;478(7367):64-69. doi:10.1038/nature10496
 158. Pellagatti A, Boultonwood J. Advances in Biological Regulation Splicing factor mutant myelodysplastic syndromes : Recent advances. *Adv Biol Regul*. 2020;75(September 2019):100655. doi:10.1016/j.jbior.2019.100655
 159. Shiozawa Y, Malcovati L, Galli A, et al. Aberrant splicing and defective mRNA production induced by somatic spliceosome mutations in myelodysplasia. *Nat Commun*. 2018. doi:10.1038/s41467-018-06063-x
 160. Pellagatti A, Armstrong RN, Steeples V, et al. Impact of spliceosome mutations on RNA splicing in myelodysplasia : dysregulated genes / pathways and clinical associations. 2018;132(12):1225-1241. doi:10.1182/blood-2018-04-843771
 161. Bondu S, Alary A, Lefèvre C, et al. A variant erythroferrone disrupts iron homeostasis in SF3B1 -mutated myelodysplastic syndrome. *Sci Trans Med*. 2019;5467(July).
 162. Lance A, Druhan LJ, Vestal CG, et al. Altered expression of CSF3R splice variants impacts signal response and is associated with SRSF2 mutations. *Leukemia*. 2019;4. doi:10.1038/s41375-019-0567-9
 163. Smith MA, Choudhary GS, Pellagatti A, et al. U2AF1 mutations induce oncogenic IRAK4 isoforms and activate innate immune pathways in myeloid malignancies. *Nat Cell Biol*. 2019. doi:10.1038/s41556-019-0314-5
 164. Lee SC, North K, Kim E, Ebert BL, Bradley RK, Abdel-wahab O. Synthetic Lethal and Convergent Biological Effects Synthetic Lethal and Convergent Biological Effects of Cancer-Associated Spliceosomal Gene Mutations. *Cancer Cell*. 2018:225-241.
 165. Chen L, Chen J, Huang Y, et al. The Augmented R-Loop Is a Unifying Mechanism for Myelodysplastic Syndromes Induced by High-Risk Article The Augmented R-Loop Is a Unifying Mechanism for Myelodysplastic Syndromes Induced by High-Risk Splicing Factor Mutations. *Mol Cell*. 2018:1-14. doi:10.1016/j.molcel.2017.12.029
 166. Nguyen HD, Leong WY, Li W, et al. Spliceosome Mutations Induce R Loop-Associated

- Sensitivity to ATR Inhibition in Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Res.* 2018;(29):5363-5375. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3970
167. Visconte V, Tabarrok A, Zhang L, et al. Splicing factor 3b subunit 1 (Sf3b1) haploinsufficient mice display features of low risk Myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts. *Journal of Hematology and Oncology.* 2014:1-10.
 168. Mupo A, Seiler M, Sathiaseelan V, et al. Hemopoietic-specific Sf3b1-K700E knock-in mice display the splicing defect seen in human MDS but develop anemia without ring sideroblasts. *Leukemia.* 2017;31(3):720-727. doi:10.1038/leu.2016.251
 169. Obeng EA, Chappell RJ, Seiler M, et al. Impaired Erythropoiesis , Aberrant Splicing , and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation Article Physiologic Expression of Sf3b1 K700E Causes Impaired Erythropoiesis , Aberrant Splicing , and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. *Cancer Cell.* 2016;30(3):404-417. doi:10.1016/j.ccell.2016.08.006
 170. Mian SA, Rouault-Pierre K, Smith AE, et al. SF3B1 mutant MDS-initiating cells may arise from the haematopoietic stem cell compartment. *Nat Commun.* 2015. doi:10.1038/ncomms10004
 171. Shirai CL, Ley JN, White BS, et al. Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo. *Cancer Cell.* 2015. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.008
 172. Fei DL, Zhen T, Durham B, et al. Impaired hematopoiesis and leukemia development in mice with a conditional knock-in allele of a mutant splicing factor gene U2af1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Published online 2018. doi:10.1073/pnas.1812669115
 173. Kon A, Nannya Y, Nakagawa M, et al. Biological Characterization of the U2af1 S34F Mutation in the Pathogenesis of Myelodysplasia. *Blood.* 2018. doi:10.1182/blood-2018-99-117453
 174. Kim E, Ilagan JO, Bradley RK, Abdel-wahab O. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition Article SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell.* 2015;27(5):617-630. doi:10.1016/j.ccell.2015.04.006
 175. Kon A, Yamazaki S, Nannya Y, et al. Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. *Blood.* 2018;131(6):621-635. doi:10.1182/blood-2017-01-762393
 176. Smeets MF, Tan SY, Xu JJ, et al. Srsf2 P95H initiates myeloid bias and myelodysplastic / myeloproliferative syndrome from hemopoietic stem cells. *Blood.* 2018;132(6).
 177. Xu JJ, Smeets MF, Tan SY, Wall M, Purton LE, Walkley CR. Modeling human RNA spliceosome mutations in the mouse: not all mice were created equal. *Exp Hematol.* 2019;70:10-23. doi:10.1016/j.exphem.2018.11.001
 178. Yoshimi A, Lin K, Wiseman DH, et al. Coordinated Alterations in RNA Splicing and Epigenetic Regulation Drive Leukaemogenesis. *Nature.* 2019/doi:10.1038/s41586-019-1618-0
 179. Tefferi A, Lasho TL, Coltro G, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 2020. doi:10.1111/bjh.16380
 180. Hautin M, Bernard D, Corcos L, Lippert E. Splicing Anomalies in Myeloproliferative Neoplasms : Paving the Way for New Therapeutic Venues. *Cancers.* 2020:1-22.
 181. Martínez-Avilés L, Besses C, Álvarez-Larrán A, et al. Mutations in the RNA splicing machinery genes in myelofibrotic transformation of essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 2014. doi:10.1111/bjh.12647
 182. Lehmann U, Bartels S, Hasemeier B, et al. SRSF2 mutation is present in the hypercellular and prefibrotic stage of primary myelofibrosis. *Blood.* 2013. doi:10.1182/blood-2012-11-467662
 183. Lasho TL, Jimma T, Finke CM, et al. SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: Significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood.* 2012;120(20):4168-4171. doi:10.1182/blood-2012-05-429696
 184. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. 2013;27(9):1861-1869. doi:10.1038/leu.2013.119
 185. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia.* 2018;32(10):2274-2278.

- doi:10.1038/s41375-018-0078-0
186. Zhang S, Rampal R, Manshouri T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. 2012;119(19):4480-4485. doi:10.1182/blood-2011-11-390252.
 187. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: A international study. *J Clin Oncol*. 2011;29(23):3179-3184. doi:10.1200/JCO.2010.34.5298
 188. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: A literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J*. 2015;5(September):1-10. doi:10.1038/bcj.2015.95
 189. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, et al. Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood*. 2007;110(3):840-846. doi:10.1182/blood-2006-12-064287
 190. Stein BL, Saraf S, Sobol U, et al. Age-related differences in disease characteristics and clinical outcomes in polycythemia vera. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(9):1989-1995. doi:10.3109/10428194.2012.759656
 191. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, et al. 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*. 2010;24(9):1574-1579. doi:10.1038/leu.2010.148
 192. Tefferi A, Lasho TL, Schwager SM, et al. The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2 V617F in polycythemia vera. *Cancer*. 2006;106(3):631-635. doi:10.1002/cncr.21645
 193. Bartels S, Faisal M, Büsche G, et al. Mutations associated with age-related clonal hematopoiesis in PMF patients with rapid progression to myelofibrosis. *Leukemia*. 2020;34(5):1364-1372. doi:10.1038/s41375-019-0668-5
 194. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *Am J Hematol*. 2016;91(9):918-922. doi:10.1002/ajh.24442
 195. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood*. 2017;129(24):3227-3236. doi:10.1182/blood-2017-01-761999
 196. Mudireddy M, Shah S, Lasho T, et al. Prefibrotic versus overtly fibrotic primary myelofibrosis: clinical, cytogenetic, molecular and prognostic comparisons. *Br J Haematol*. 2018;182(4):594-597. doi:10.1111/bjh.14838
 197. Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis — A Common Pathway to Organ Injury and Failure. *N Engl J Med*. 2015;372(12):1138-1149. doi:10.1056/nejmra1300575
 198. Wernig G, Chen SY, Cui L, et al. Unifying mechanism for different fibrotic diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(18):4757-4762. doi:10.1073/pnas.1621375114
 199. Wynn TA, Ramalingam TR. Mechanisms of fibrosis: Therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med*. 2012;18(7):1028-1040. doi:10.1038/nm.2807
 200. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. *Cell Stem Cell*. 2017;21(2):166-177. doi:10.1016/j.stem.2017.07.011
 201. Pinho S, Lacombe J, Hanoun M, et al. PDGFR α and CD51 mark human Nestin+ sphere-forming mesenchymal stem cells capable of hematopoietic progenitor cell expansion. *J Exp Med*. 2013;210(7):1351-1367. doi:10.1084/jem.20122252
 202. Kuppe C, Ibrahim MM, Kranz J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis. *Nature*. 2021. doi:10.1038/s41586-020-2941-1
 203. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*. 2013. doi:10.1038/ncomms3823

204. Kramann R, Schneider RK, Dirocco DP, et al. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2015. doi:10.1016/j.stem.2014.11.004
205. Xie T, Liang J, Liu N, et al. Transcription factor TBX4 regulates myofibroblast accumulation and lung fibrosis. *J Clin Invest*. 2016. doi:10.1172/JCI85328
206. Plikus M V., Guerrero-Juarez CF, Ito M, et al. Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*. 2017. doi:10.1126/science.aai8792
207. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, Van Der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005.
208. Teman CJ, Wilson AR, Perkins SL, Hickman K, Prchal JT, Salama ME. Quantification of fibrosis and osteosclerosis in myeloproliferative neoplasms: A computer-assisted image study. *Leuk Res*. 2010;34(7):871-876. doi:10.1016/j.leukres.2010.01.005
209. Castro-Malaspina H, Gay RE, Jhanwar SC, et al. Characteristics of bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny in patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1982. doi:10.1182/blood.v59.5.1046.1046
210. Greenberg BR, Woo L, Veomett IC, Payne CM, Ahmann FR. Cytogenetics of bone marrow fibroblastic cells in idiopathic chronic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1987;66(4):487-490. doi:10.1111/j.1365-2141.1987.tb01332.x
211. Wang JC, Lang H -D, Lichter S, Weinstein M, Benn P. Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultured from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 1992. doi:10.1111/j.1365-2141.1992.tb08898.x
212. Verstovsek S, Manshouri T, Pilling D, et al. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. *J Exp Med*. 2016;213(9):1723-1740. doi:10.1084/jem.20160283
213. Decker M, Martinez-Morentin L, Wang G, et al. Leptin-receptor-expressing bone marrow stromal cells are myofibroblasts in primary myelofibrosis. *Nat Cell Biol*. 2017;19(6):677-688. doi:10.1038/ncb3530
214. Schneider RK, Mullally A, Dugourd A, et al. Gli1+ Mesenchymal Stromal Cells Are a Key Driver of Bone Marrow Fibrosis and an Important Cellular Therapeutic Target. *Cell Stem Cell*. 2017;20(6):785-800.e8. doi:10.1016/j.stem.2017.03.008
215. Leimkühler NB, Gleitz HFE, Ronghui L, et al. Heterogeneous bone-marrow stromal progenitors drive myelofibrosis via a druggable alarmin axis. *Cell Stem Cell*. 2020:1-16. doi:10.1016/j.stem.2020.11.004
216. Schepers K, Pietras EM, Reynaud D, et al. Myeloproliferative neoplasia remodels the endosteal bone marrow niche into a self-reinforcing leukemic niche. *Cell Stem Cell*. 2013;13(3):285-299. doi:10.1016/j.stem.2013.06.009
217. Arranz L, Sánchez-Aguilera A, Martín-Pérez D, et al. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature*. 2014;512(1):78-81. doi:10.1038/nature13383
218. Malara A, Gruppi C, Abbonante V, et al. EDA fibronectin–TLR4 axis sustains megakaryocyte expansion and inflammation in bone marrow fibrosis. *J Exp Med*. 2019;216(3):587-604. doi:10.1084/jem.20181074
219. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: A comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011;29(10):1356-1363. doi:10.1200/JCO.2010.32.9490
220. Fisher DAC, Miner CA, Engle EK, et al. Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NFκB signaling. *Leukemia*. 2019;33(8):1978-1995. doi:10.1038/s41375-019-0379-y
221. Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, et al. JAK-STAT pathway activation in malignant and nonmalignant cells contributes to MPN pathogenesis and therapeutic response. *Cancer Discov*. 2015;5(3):316-331. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0736
222. Martyré M -C, Magdelenat H, Bryckaert M -C, Laine-Bidron C, Calvo F. Increased intraplatelet

- levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 1991. doi:10.1111/j.1365-2141.1991.tb07952.x
223. Shehata M, Schwarzmeier JD, Hilgarth M, Hubmann R, Duechler M, Gisslinger H. TGF- β 1 induces bone marrow reticulin fibrosis in hairy cell leukemia. *J Clin Invest*. 2004. doi:10.1172/JCI19540
 224. Yanagida M, Ide Y, Imai A, et al. The role of transforming growth factor- β in PEG-rHuMGDF-induced reversible myelofibrosis in rats. *Br J Haematol*. 1997;99(4):739-745. doi:10.1046/j.1365-2141.1997.4843288.x
 225. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;110(3):986-993. doi:10.1182/blood-2006-12-064626
 226. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendung F. Prominent role of TGF- β 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*. 2002;100(10):3495-3503. doi:10.1182/blood-2002-04-1133
 227. Gersuk GM, Carmel R, Pattengale PK. Platelet-derived growth factor concentrations in platelet-poor plasma and urine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 1989. doi:10.1182/blood.v74.7.2330.bloodjournal7472330
 228. Kramer F, Dervede J, Mezheyski A, Tauber R, Micke P, Kappert K. Platelet-derived growth factor receptor b activation and regulation in murine myelofibrosis. *Haematologica*. 2020;105(8):2083-2094. doi:10.3324/haematol.2019.226332
 229. Gleitz HLFE, Dugourd ALJF, Leimkühler NB, et al. Increased CXCL4 expression in hematopoietic cells links inflammation and progression of bone marrow fibrosis in MPN. *Blood*. 2020;136(18):2051-2064. doi:10.1182/BLOOD.2019004095
 230. Di Raimondo F, Azzaro MP, Palumbo GA, et al. Elevated vascular endothelial growth factor (VEGF) serum levels in idiopathic myelofibrosis. *Leukemia*. 2001;15(6):976-980. doi:10.1038/sj.leu.2402124
 231. Chagraoui H, Tulliez M, Smayra T, et al. Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO. *Blood*. 2003;101(8):2983-2989. doi:10.1182/blood-2002-09-2839
 232. Castaño AP, Lin SL, Surowy T, et al. Serum amyloid P inhibits fibrosis through Fc γ R-dependent monocyte-macrophage regulation in vivo. *Sci Transl Med*. 2009. doi:10.1126/scitranslmed.3000111
 233. Cox N, Pilling D, Gomer RH, Ravetch J V. DC-SIGN activation mediates the differential effects of SAP and CRP on the innate immune system and inhibits fibrosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(27):8385-8390. doi:10.1073/pnas.1500956112
 234. Psaila B, Wang G, Rodriguez-Meira A, et al. Single-Cell Analyses Reveal Megakaryocyte-Biased Hematopoiesis in Myelofibrosis and Identify Mutant Clone-Specific Targets. *Mol Cell*. 2020;78(3):477-492.e8. doi:10.1016/j.molcel.2020.04.008
 235. Jacquelin S, Kramer F, Mullally A, Lane SW. Murine Models of Myelofibrosis. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2381. doi:10.3390/cancers12092381
 236. Yan XQ, Lacey D, Fletcher F, et al. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. *Blood*. 1995;86(11):4025-4033. doi:10.1182/blood.v86.11.4025.bloodjournal86114025
 237. Kuter DJ, Mufti GJ, Bain BJ, Hasserjian RP, Davis W, Rutstein M. Evaluation of bone marrow reticulin formation in chronic immune thrombocytopenia patients treated with romiplostim. *Blood*. 2009;114(18):3748-3756. doi:10.1182/blood-2009-05-224766
 238. Vannucchi AM, Bianchi L, Cellai C, et al. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1low mice). *Blood*. 2002;100(4):1123-1132. doi:10.1182/blood-2002-06-1913
 239. Woods B, Chen W, Chiu S, et al. Activation of JAK/STAT signaling in megakaryocytes sustains myeloproliferation in vivo. *Clin Cancer Res*. 2019;25(19):5901-5912. doi:10.1158/1078-

- 0432.CCR-18-4089
240. Mansier O, Kilani B, Guitart A V., et al. Description of a knock-in mouse model of JAK2V617F MPN emerging from a minority of mutated hematopoietic stem cells. *Blood*. 2019;134(26):2383-2387. doi:10.1182/blood.2019001163
241. Jeremy Wen Q, Yang Q, Goldenson B, et al. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat Med*. 2015;21(12):1473-1480. doi:10.1038/nm.3995
242. Gangat N, Marinaccio C, Swords R, et al. Aurora kinase A inhibition provides clinical benefit, normalizes megakaryocytes, and reduces bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis: A phase I trial. *Clin Cancer Res*. 2019;25(16):4898-4906. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1005
243. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood*. 1981. doi:10.1182/blood.v57.4.781.781
244. Fava RA, Casey TT, Wilcox J, Pelton RW, Moses HL, Nanney LB. Synthesis of transforming growth factor- β 1 by megakaryocytes and its localization to megakaryocyte and platelet α -granules. *Blood*. 1990;76(10):1946-1955. doi:10.1182/blood.v76.10.1946.1946
245. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood*. 2000;96(4):1342-1347. doi:10.1182/blood.v96.4.1342
246. Zingariello M, Ruggeri A, Martelli F, et al. A novel interaction between megakaryocytes and activated fibrocytes increases TGF- β bioavailability in the Gata1(low) mouse model of myelofibrosis. *Am J Blood Res*. 2015;5(2):34-61.
247. Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, et al. Increased and pathologic emperipoiesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1low mice. *Blood*. 2004;104(12):3573-3580. doi:10.1182/blood-2004-01-0193
248. Spangrude GJ, Lewandowski D, Martelli F, et al. P-Selectin Sustains Extramedullary Hematopoiesis in the Gata1low Model of Myelofibrosis. *Stem Cells*. 2016;34(1):67-82. doi:10.1002/stem.2229
249. Yue L, Bartenstein M, Zhao W, et al. Efficacy of ALK5 inhibition in myelofibrosis. *JCI Insight*. 2017;2(7). doi:10.1172/jci.insight.90932DS1
250. Burstein SA, Malpass TW, Yee E, et al. Platelet factor-4 excretion in myeloproliferative disease: implications for the aetiology of myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1984. doi:10.1111/j.1365-2141.1984.tb02912.x
251. van Bon L, Affandi AJ, Broen J, et al. Proteome-wide Analysis and CXCL4 as a Biomarker in Systemic Sclerosis. *N Engl J Med*. 2014. doi:10.1056/nejmoa1114576
252. Rameshwar P, Denny TN, Stein D, Gascón P. Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines: Potential role for interleukin-1 and TGF- β . *J Immunol*. 1994;153(6):2819-28130.
253. Wagner-Ballon O, Chagraoui H, Prina E, et al. Monocyte/Macrophage Dysfunctions Do Not Impair the Promotion of Myelofibrosis by High Levels of Thrombopoietin. *J Immunol*. 2006;176(11):6425-6433. doi:10.4049/jimmunol.176.11.6425
254. Maekawa T, Osawa Y, Izumi T, et al. Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia*. 2017;31(12):2709-2716. doi:10.1038/leu.2017.112
255. Maekawa T, Kato S, Kawamura T, et al. Increased SLAMF7 high monocytes in myelofibrosis patients harboring JAK2 V617F provide a therapeutic target of elotuzumab. *Blood*. 2019;134(10).
256. Wakahashi K, Minagawa K, Kawano Y, et al. Vitamin D receptor-mediated skewed differentiation of macrophages initiates myelofibrosis and subsequent osteosclerosis. *Blood*. 2019;133(15):1619-1629. doi:10.1182/blood-2018-09-876615
257. Venton G, Courtier F, Charbonnier A, et al. Impact of gene mutations on treatment response and prognosis of acute myeloid leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *Am J*

- Hematol.* 2018;93(3):330-338. doi:10.1002/ajh.24973
258. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International working group for myelofibrosis research and treatment. *Blood.* 2009;113(13):2895-2901. doi:10.1182/blood-2008-07-170449
259. Tefferi A, Mudireddy M, Mannelli F, et al. Blast phase myeloproliferative neoplasm: Mayo-AGIMM study of 410 patients from two separate cohorts. *Leukemia.* 2018;32(5):1200-1210. doi:10.1038/s41375-018-0019-y
260. Zhang SJ, Rampal R, Manshoury T, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. *Blood.* 2012;119(19):4480-4485. doi:10.1182/blood-2011-11-390252
261. Dunbar AJ, Rampal RK, Levine R. Leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2020;136(1):61-70. doi:10.1182/blood.2019000943
262. Rampal R, Ahn J, Abdel-Wahaba O, et al. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):E5401-E5410. doi:10.1073/pnas.1407792111
263. Kubesova B, Pavlova S, Malcikova J, et al. Low-burden TP53 mutations in chronic phase of myeloproliferative neoplasms: Association with age, hydroxyurea administration, disease type and JAK2 mutational status. *Leukemia.* 2018;32(2):450-461. doi:10.1038/leu.2017.230
264. Kagoya Y, Yoshimi A, Kataoka K, et al. Positive feedback between NF- κ B and TNF- α promotes leukemia-initiating cell capacity. *J Clin Invest.* 2014;124(2):528-542. doi:10.1172/JCI68101
265. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: Timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood.* 2006;108(10):3548-3555. doi:10.1182/blood-2005-12-013748
266. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood.* 2007;110(1):375-379. doi:10.1182/blood-2006-12-062125
267. Beer PA, Delhommeau F, LeCouédic JP, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood.* 2010;115(14):2891-2900. doi:10.1182/blood-2009-08-236596
268. Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, et al. JAK2V617F+ myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. *Blood.* 2014;124(19):2996-3006. doi:10.1182/blood-2014-04-570572
269. McKerrell T, Park N, Moreno T, et al. Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis. *Cell Rep.* 2015. doi:10.1016/j.celrep.2015.02.005
270. McNamara CJ, Panzarella T, Kennedy JA, et al. The mutational landscape of accelerated- and blast-phase myeloproliferative neoplasms impacts patient outcomes. *Blood Adv.* 2018;2(20):2658-2671. doi:10.1182/bloodadvances.2018021469
271. Lasho TL, Mudireddy M, Finke CM, et al. Targeted next-generation sequencing in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Blood Adv.* 2018;2(4):370-380. doi:10.1182/bloodadvances.2018015875
272. Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, et al. Crucial role of hematopoietic JAK2 V617F in the development of aortic aneurysms. *Haematologica.* 2021;106(7):1910-1922. doi:10.3324/haematol.2020.264085
273. Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N, et al. Vascular endothelial cell expression of JAK2 V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. *Haematologica.* 2019;104(1):70-81. doi:10.3324/haematol.2018.195321
274. Wanlong M, Kantarjian H, Zhang X, et al. Mutation profile of JAK2 transcripts in patients with chronic myeloproliferative neoplasias. *J Mol Diagnostics.* 2009;11(1):49-53. doi:10.2353/jmoldx.2009.080114
275. Ma W, Kantarjian H, Zhang X, et al. JAK2 exon 14 deletion in patients with chronic myeloproliferative neoplasms. *PLoS One.* 2010;5(8):8-14. doi:10.1371/journal.pone.0012165

276. Catarsi P, Rosti V, Morreale G, et al. JAK2 exon 14 skipping in patients with primary myelofibrosis: A minor splice variant modulated by the JAK2-V617F allele burden. *PLoS One*. 2015;10(1):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0116636
277. Nauroy P, Delhommeau F, Baklouti F. JAK2V617F mRNA metabolism in myeloproliferative neoplasm cell lines. *Blood Cancer J*. 2014;4(6):1-4. doi:10.1038/bcj.2014.43
278. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*. 2002;277(49):47954-47963. doi:10.1074/jbc.M205156200
279. Lee TS, Ma W, Zhang X, Kantarjian H, Albitar M. Structural effects of clinically observed mutations in JAK2 exons 13-15: Comparison with V617F and exon 12 mutations. *BMC Struct Biol*. 2009;9:1-14. doi:10.1186/1472-6807-9-58
280. Kleppe M, Koche R, Zou L, et al. Dual Targeting of Oncogenic Activation and Inflammatory Signaling Increases Therapeutic Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell*. 2018;33(1):29-43.e7. doi:10.1016/j.ccell.2017.11.009
281. Fisher DAC, Malkova O, Engle EK, et al. Mass cytometry analysis reveals hyperactive NF Kappa B signaling in myelofibrosis and secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2017;31(9):1962-1974. doi:10.1038/leu.2016.377
282. Baumeister J, Maié T, Chatain N, et al. Early and late stage MPN patients show distinct gene expression profiles in CD34+ cells. *Ann Hematol*. 2021;(0123456789). doi:10.1007/s00277-021-04615-8
283. Hsu TYT, Simon LM, Neill NJ, et al. The spliceosome is a therapeutic vulnerability in MYC-driven cancer. *Nature*. 2015;525(7569):384-388. doi:10.1038/nature14985
284. Koh CM, Bezzi M, Low DHP, et al. MYC regulates the core pre-mRNA splicing machinery as an essential step in lymphomagenesis. *Nature*. 2015;523(7558):96-100. doi:10.1038/nature14351
285. Guo Y, Niu C, Breslin P, et al. c-Myc-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Blood*. 2009;114(10):2097-2106. doi:10.1182/blood-2009-01-197947
286. Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. *Blood*. 2014;123(14):2157-2160. doi:10.1182/blood-2013-11-536557
287. Spiegel JY, McNamara C, Kennedy JA, et al. Impact of genomic alterations on outcomes in myelofibrosis patients undergoing JAK1/2 inhibitor therapy. *Blood Adv*. 2017;1(20):1729-1738. doi:10.1182/bloodadvances.2017009530
288. O'Sullivan JM, Hamblin A, Yap C, et al. The poor outcome in high molecular risk, hydroxycarbamide-resistant/intolerant ET is not ameliorated by ruxolitinib. *Blood*. 2019;134(23):2107-2111. doi:10.1182/blood.2019001861
289. Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- α in a murine model of polycythemia vera. *Blood*. 2013;121(18):3692-3702. doi:10.1182/blood-2012-05-432989
290. Mosca M, Hermange G, Tisserand A, et al. Inferring the dynamic of mutated hematopoietic stem and progenitor cells induced by IFN α in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2021. doi:10.1182/blood.2021010986
291. Silver RT, Barel AC, Lascu E, et al. The effect of initial molecular profile on response to recombinant interferon- α (rIFN α) treatment in early myelofibrosis. *Cancer*. 2017;123(14):2680-2687. doi:10.1002/cncr.30679
292. Ianotto JC, Chauveau A, Boyer-Perrard F, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: A French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018;103(3):438-446. doi:10.3324/haematol.2017.181297
293. Seiler M, Yoshimi A, Darman R, et al. H3B-8800, an orally available small-molecule splicing modulator, induces lethality in spliceosome-mutant cancers. 2018;(February). doi:10.1038/nm.4493

294. Jayavelu AK, Schnöder TM, Perner F, et al. Splicing factor YBX1 mediates persistence of JAK2-mutated neoplasms. *Nature*. 2020;588(7836):157-163. doi:10.1038/s41586-020-2968-3
295. Pastore F, Bhagwat N, Pastore A, et al. Prmt5 inhibition modulates e2f1 methylation and gene-regulatory networks leading to therapeutic efficacy in jak2v617f-mutant mpn. *Cancer Discov*. 2020;10(11):1742-1757. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0026
296. Fong JY, Pignata L, Goy PA, et al. Therapeutic Targeting of RNA Splicing Catalysis through Inhibition of Protein Arginine Methylation. *Cancer Cell*. 2019;36(2):194-209.e9. doi:10.1016/j.ccell.2019.07.003

Publications et Communications en congrès

Publications scientifiques au cours de la thèse

Inherited transmission of the CSF3R T618I mutational hotspot in familial chronic neutrophilic leukemia.

Duployez N, **Willekens C**, Plo I, Marceau-Renaut A, de Botton S, Fenwarth L, Boyer T, Huet G, Nibourel O, Rose C, Nelken B, Quesnel B, Preudhomme C.
Blood. 2019. PMID: 31697825.

Biology and prognostic impact of clonal plasmacytoid dendritic cells in chronic myelomonocytic leukemia.

Lucas N, Duchmann M, Rameau P, Noël F, Michea P, Saada V, Kosmider O, Pierron G, Fernandez-Zapico ME, Howard MT, King RL, Niyongere S, Diop MK, Fenaux P, Itzykson R, **Willekens C**, Ribrag V, Fontenay M, Padron E, Soumelis V, Droin N, Patnaik MM, Solary E.
Leukemia. 2019. PMID: 30894665.

A miR-150/TET3 pathway regulates the generation of mouse and human non-classical monocyte subset.

Selimoglu-Buet D, Rivière J, Ghamlouch H, Bencheikh L, Lacout C, Morabito M, Diop M, Meurice G, Breckler M, Chauveau A, Debord C, Debeurme F, Itzykson R, Chapuis N, **Willekens C**, Wagner-Ballon O, Bernard OA, Droin N, Solary E.
Nat Commun. 2018. PMID: 30575719.

Présentation en congrès

Congrès du Club Hématopoïèse et Oncogénèse 2019 : prix du meilleur poster

Titre : Coopération entre les mutations Jak2 V617F et Srsf2 P95H dans le système hématopoïétique.

Mots clés : néoplasmes myéloprolifératifs, modèles murins, *JAK2*, signalisation, *SRSF2*, épissage

Résumé : La mutation *JAK2*^{V617F} est fréquemment observée en cas de néoplasme myéloprolifératif (NMP). D'autres mutations somatiques peuvent être associées et sont corrélées au stade myélofibrotique ou à une évolution en leucémie aigüe. L'une de ces mutations touche le gène *SRSF2*, codant pour une protéine du complexe d'épissage. Pour étudier l'interaction entre les mutations *Jak2*^{V617F} et *Srsf2*^{P95H} dans le tissu hématopoïétique, nous avons généré un modèle murin knock-in conditionnel des deux mutations s'exprimant sous le contrôle du gène *Scf*. Notre étude montre que *Srsf2*^{P95H} limite peu le développement de la polyglobulie et de la thrombocytose induites par *Jak2*^{V617F} mais freine l'évolution vers une fibrose médullaire et protège les cellules souches hématopoïétiques de l'épuisement en transplantations sériées. L'étude des mégacaryocytes (MK), impliqués dans le processus

fibrotique, montre que *Srsf2*^{P95H} induit une quasi-normalisation des anomalies induites par *Jak2*^{V617F} (taille, ploïdisation, expression de c-Mpl). L'analyse de la signalisation c-Mpl/Jak2 par cytométrie de masse révèle une discrète diminution de la proportion de MK exprimant de haut niveau de P-Stat5 en cas de mutation *Srsf2*^{P95H} associée à *Jak2*^{V617F} tandis que l'injection d'un agoniste de la thrombopoïétine à fortes doses confirme l'impact négatif de *Srsf2*^{P95H} sur le développement de la fibrose. L'étude de l'expression génique de MK triés confirme l'altération de la voie Jak/Stat induite par *Srsf2*^{P95H} et révèle que *Srsf2*^{P95H} induit plus fréquemment une perte de l'exon 14 (incluant la mutation V617F) de l'ARNm de *Jak2*. Ce résultat est confirmé sur des échantillons de granulocytes de patients atteints de NMP *JAK2*^{V617F} avec mutation *SRSF2*^{P95H} associée.

Title : Cooperation between Jak2 V617F and Srsf2 P95H in hematopoietic system

Keywords : myeloproliferative neoplasms, mouse model, *JAK2*, signaling, *SRSF2*, splicing

Abstract: *JAK2*^{V617F} mutation is frequently identified in myeloproliferative neoplasms (MPN). Additional somatic variants are supposed to contribute to bone marrow fibrosis or acute myeloid leukemia evolution. One of these mutations affects *SRSF2*, a gene encoding a component of the splicing machinery. To investigate how *Jak2*^{V617F} and *Srsf2*^{P95H} mutations interact in the hematopoietic tissue, we generated conditional knock-in mice in which the two mutations were expressed upon the control of *Scf* gene. Our study shows that *Srsf2*^{P95H} mutation initially exhibits limited effect on *Jak2*^{V617F} polycythemia and thrombocytosis but induces a delay in myelofibrosis development and protect hematopoietic stem cell from exhaustion observed after serial transplantation in *Jak2*^{V617F} single mutant cells. We focused on megakaryocyte (MK), implied in fibrosis development and found that *Srsf2*^{P95H} partially reversed MK

abnormalities induced by *Jak2*^{V617F} (cell size, normalized ploidy and expression of c-Mpl). Analysis of c-Mpl/Jak2 signaling with mass cytometry revealed a slight reduced proportion of MK expressing high levels of P-Stat5 in case of *Srsf2*^{P95H} co-occurrence with *Jak2*^{V617F} while treatment with high dose of the thrombopoietin-mimetic romiplostim in mice transplanted with wild-type or *Srsf2*^{P95H} bone marrow cells confirms the negative impact of *Srsf2*^{P95H} on fibrosis development. Gene expression analysis on sorted MK confirms down-regulation of Jak/Stat signaling pathway induced by *Srsf2*^{P95H} and reveals that *Srsf2*^{P95H} mutation more frequently induces exon 14 skipping of *Jak2* mRNA. These result was confirmed in granulocytes samples from patients with *JAK2*^{V617F} MPN with associated *SRSF2*^{P95H} mutation.