



**HAL**  
open science

# L'autophagie, cible thérapeutique potentielle dans les néoplasies myéloprolifératives JAK2V617F

Charly Courdy

► **To cite this version:**

Charly Courdy. L'autophagie, cible thérapeutique potentielle dans les néoplasies myéloprolifératives JAK2V617F. Immunologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30189 . tel-04001635

**HAL Id: tel-04001635**

**<https://theses.hal.science/tel-04001635v1>**

Submitted on 23 Feb 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Charly COURDY**

Le 5 décembre 2022

**L'autophagie, cible thérapeutique potentielle dans les Néoplasies  
Myéloprolifératives JAK2V617F**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :  
**CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse**

Thèse dirigée par  
**Véronique DE MAS et Carine JOFFRE**

Jury

M. Eric LIPPERT, Rapporteur  
Mme Mojgan DJAVAHERY-MERGNY, Rapporteur  
Mme Caroline MARTY, Rapporteur  
Mme Véronique DE MAS, Directrice de thèse  
Mme Carine JOFFRE, Co-directrice de thèse  
Mme Estelle ESPINOS, Présidente



# **REMERCIEMENTS**

Je remercie les membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'évaluer mes travaux. Je remercie mes rapporteurs **Éric Lippert**, **Caroline Marty** et **Mojgan Mergny** pour leur implication et leurs remarques très constructives. Je remercie également **Estelle Espinos** de s'être rendue disponible pour présider ce jury.

Je remercie les membres de mon comité de thèse **Isabelle Plo** et **Cécile Vindis** pour leurs conseils avisés lors de nos réunions. Je remercie plus particulièrement **Isabelle Plo** de m'avoir accueilli à Villejuif dans son laboratoire pour me former sur l'utilisation des modèles murins. J'espère que notre collaboration portera ses fruits et aboutira à la publication d'un article de qualité.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnels hospitaliers qui m'ont permis d'obtenir tous ces échantillons précieux de cellules de patients. Merci à **Suzanne Tavitian**, **Sarah Bertoli** et **Pierre Cougoul** pour leur collaboration. Je remercie également l'ensemble des **infirmières du service d'hospitalisation de jour** de l'IUCT qui ont mis en pratique cette collaboration et avec qui il a toujours été facile de discuter malgré leur emploi du temps chargé.

Merci à l'ensemble des membres du pôle technologique du CRCT, et plus particulièrement **Manon Farcé**, **Laetitia Ligat** et **Nathalie Saint-Laurent**, pour votre travail de qualité, votre écoute et votre disponibilité.

Je tiens à remercier vivement mes deux directrices de thèse **Véronique De Mas** et **Carine Joffre**. Ces cinq années passées ensemble auront été très enrichissantes. Merci d'avoir partagé avec moi votre expérience et votre engouement dans vos domaines de prédilection respectifs, les NMP et l'autophagie. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu durant ces cinq années, depuis le stage de M2 jusqu'à la fin de cette thèse. J'ai beaucoup apprécié toutes les discussions que nous avons pu avoir tous les trois et qui m'ont fait grandir sur de nombreux aspects, scientifiquement et humainement parlant. Merci à toutes les deux pour votre gentillesse, votre patience et votre immense générosité. Je pars vers de nouveaux horizons riche de tout ce que vous m'avez transmis et j'espère vivement que nos routes se croiseront à nouveau un jour.

Je remercie **Stéphane Manenti** pour m'avoir initié au monde de la recherche au sein de l'équipe 8 du CRCT. Tu as toujours été très disponible pour discuter, comme lors de nos premières réunions hebdomadaires dans le petit bureau, et même pour retourner à la paillasse à mes côtés ! Merci pour tous tes conseils à la fois pratiques et théoriques qui m'ont toujours été d'une grande aide mais aussi pour tes conseils sur les balades à vélo et sur les coins pour aller à la pêche dans les Pyrénées !

Je tiens à remercier **Jean-Emmanuel Sarry** pour son accueil à mon arrivée dans l'équipe 18 du CRCT. Merci d'avoir contribué à mon évolution au sein d'une équipe exceptionnelle pleine de ressources sur le plan scientifique et humain. Merci également d'être retourné mettre la main à la pâte pour m'aider en dissection lorsque personne d'autre ne le pouvait.

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui j'ai pu côtoyer pendant mes trois années passées au CRCT dans l'équipe 8. Merci à **Maëlle, Véronique, Christine, Charlotte, Alexandre, Sylvie, Camille, Carine, Stéphane, Laurent, Patricia, Trang, Domenico** et **Gabrielle** pour tous ces moments de partage comme lors de nos déjeunés toujours très animés.

Merci tout particulièrement à **Alex, Gabi et Maëlle** mes premiers collègues de bureau, vous avez mis des paillettes dans ma vie, au sens propre comme au figuré !

Je remercie tous les membres de l'équipe 18 pour l'ensemble des échanges que nous avons pu avoir durant ces deux dernières années, vous formez une équipe d'une grande qualité scientifique et où travailler devient un plaisir. Merci à **Emeline, Guillaume, Thibault, Véronique, Charlotte, Thomas, Margherita, Léa, Fanny, Nathan, Alexis, Latifa, Carine, Mathieu, Clément, Laura L, Jean, Margaux, Loïc, Laura P, Nathaniel, Gonçalo, Marie, Ambrine, Estelle, Jean-Emmanuel, Helena et Lucille**. Merci également à **Anne-Marie** notre gestionnaire qui réalise un travail de grande qualité.

Merci plus particulièrement à **Nathan et Estelle**, mes compagnons de rédaction en cette fin de thèse, à **Emeline, Charlotte et Ambrine** toujours présentes pour mettre l'ambiance dans le bureau. Merci à **Loïc** qui commence sa thèse dans l'équipe, profite au maximum de cette expérience ! Merci à **Léa et Laura L**, les deux inséparables, bon courage pour la révision et au plaisir de vous revoir... le lundi... en Lauturie ! Merci aux M&M's **Mathieu et Margaux** pour les parties de rigolade, vous formez une équipe de choc ! Merci **Alexis** pour ton humour toujours aussi pertinent, quel honneur de pouvoir entrer dans ton réseau !

Je tiens à remercier plus particulièrement **Charlotte**, ma meilleure binôme, pour tous les moments passés ensemble au laboratoire comme en dehors sur les marchés, à la montagne et maintenant à démonter des meubles ! Je ne sais pas lequel de nous deux a le plus dû supporter les délires psychotiques de l'autre mais cela a toujours été un immense plaisir, alors merci pour tout Chacha !

Merci à tous d'avoir supporté mes blagues nulles, vous penserez à moi le jour où on verra des vitres courir au fond du jardin ! Vous avez toujours su égayer le quotidien et nous pouvions toujours compter les uns sur les autres pour avancer même dans les moments difficiles.

Continuez comme ça, ayez confiance en vous et tout vous sera possible car vous êtes des personnes exceptionnelles !

Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu rencontrer dans les autres équipes du CRCT. Merci aux copains des équipes 4 et 10 **Carine, Mathieu, Claire, Lorraine** et **Guillaume** pour les parties de rigolade, et pour ce fameux concours de gifles auquel vous avez participé de manière plus ou moins volontaire...

Merci à tous les copains qui m'ont accompagné dans la vie de tous les jours durant ces dernières années. Merci à tous les badistes qui m'ont permis de me vider la tête que ce soit dans les gymnases, au cours de nos week-ends bad ou lors de nos traditionnelles soirées à la pizzeria le dimanche soir. Merci à **Adeline** et **Manon** pour les sorties estivales à Saint-Orens qui se terminaient bien souvent à discuter tard le soir autour d'un bon repas bien diététique ! Merci aux deux licornes **Marie** et **Loïc** ainsi qu'aux manchac' **Thomas, Deborah** et **Baptiste** pour tous ces instants de rigolade et de détente. Et on enfonce le clou !

Merci aux copains de l'Aveyron les colibris **Nathan, Jérémy, Rudolf, Ian** et **Axel**. Chacune de nos retrouvailles est un pur moment de bonheur et surtout de délire ! Vivement la prochaine !

Merci également à tous les amis d'Ariège que j'ai rencontrés durant ces dernières années à Toulouse. Merci à **Camille, Harry, Amandine, Yohan, Mathilde, Anthony, Primiano, Jenni, Alvin** et **Tiziana** pour tous ces moments partagés autour d'un verre ou lors de nos parties acharnées de 7-wonders.

Je tiens tout particulièrement à remercier **Camille** pour m'avoir accompagné pendant ces cinq années. Je garderai toujours un souvenir heureux de ce temps passé ensemble. Merci pour tout ce que nous avons vécu et partagé, je te souhaite plein de bonnes choses pour l'avenir car tu le mérites tellement !

Cette aventure a également été possible grâce au soutien de toute ma famille que je tiens à remercier chaleureusement. Merci **Papa** et **Maman** d'avoir toujours continué à croire à moi. Vous m'avez encouragé et même parfois porté mais toujours en m'accordant votre entière confiance. Merci de m'avoir appris à aimer les choses simples de la vie, de m'avoir inculqué l'amour de la nature et du partage avec les êtres qui me sont chers. Même si je sais aussi de qui je tiens mon côté pas toujours très bien organisé ! Bref, vous avez fait de moi ce que je suis aujourd'hui alors merci pour tout. Je vous aime !

Merci à mes frères et sœurs **Théo, Noémie** et **Enola**. Nous avons partagé tellement de choses depuis toutes ces années que je ne sais même pas par quoi commencer. Titou et Mimie, je suis tellement fier des adultes que vous êtes devenus, même si en tant que grand frère je ne pourrai jamais me retenir de surveiller ce que vous faites haha ! Vous pourrez toujours compter sur moi dans chaque instant de vos vies, je vous aime fort !

Je remercie **mes grands-parents**, du Rouquet comme du Vigan. Les moments passés avec vous sont toujours si reposants. Merci pour tous ces souvenirs si précieux au jardin, à greffer des arbres, à la pêche, à la cueillette des champignons, lors des parties de belote ou à table autour d'un bon plat de pâtes. Merci à vous d'avoir toujours fait tant d'efforts pour chercher à nous rassembler et à partager avec nous. Votre famille vous aime ! Je vous aime !

Je remercie toute ma famille pour chaque instant passé ensemble, merci à mes oncles et tantes **Agnès, Serge, Véro** et **Lulu, Clarisse, Anne-Marie, Jean-Pascal, Cathy, Joseph, Alain** et **Véro**. Merci à **Gilles** mon beau-père de prendre tant soin de ma petite maman. Merci à **David** et **Anaïs** de rendre heureux ma sœur et mon frère, c'est un plaisir de vous connaître. Merci enfin à tous mes couz' **Chloé, Jonathan, Léa, Valentin, Ugo, Lisa, Malvina, Manuela, Thomas, Adrien, Eva** et **Eli**. Mes pensées vont également vers mes oncles **Fernand** et **Raphaël** qui nous regardent de là où ils sont. Tous ces moments de joie passés ensemble font de vous une source d'énergie inépuisable qui permet de gravir chaque montagne. Ma famille ma base ! Je vous aime tous très fort !





# **RESUMÉ EN FRANÇAIS**

Les Néoplasies Myéloprolifératives (NMP) représentent un groupe d'hémopathies malignes chroniques caractérisées par une expansion clonale excessive de cellules de la lignée myéloïde. L'expression fréquente de la tyrosine kinase mutée JAK2<sup>V617F</sup> dans ces pathologies a conduit au développement d'inhibiteurs de JAK1/JAK2 comme le ruxolitinib, utilisés aujourd'hui en clinique. Cependant, les bénéfices du ruxolitinib se sont avérés limités. Ainsi, une majorité de patients interrompent leur traitement en raison de réponses partielles ou non durables ou d'effets indésirables hématologiques principalement dus à un manque de spécificité du traitement vis-à-vis des cellules tumorales. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de NMP. Au cours de ma thèse, j'ai émis l'hypothèse que l'autophagie, un processus catabolique impliqué dans la biologie des cellules cancéreuses, participait à la résistance au ruxolitinib dans ces pathologies.

L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage de composés cellulaires. C'est un mécanisme finement régulé qui permet aux cellules de répondre et de s'adapter à de nombreux stress. Ces dernières années, plusieurs études ont établi un lien étroit entre autophagie et cancer. En effet, les cellules tumorales détournent l'autophagie à leur propre avantage pour proliférer et survivre dans des conditions environnementales extrêmes et même résister aux thérapies anti-cancéreuses. Dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, le rôle de l'autophagie n'a été que peu étudié. Mon projet de thèse vise donc à caractériser dans ces cancers la contribution de l'autophagie dans la mise en place des mécanismes de résistance au ruxolitinib.

Les résultats que j'ai obtenus montrent tout d'abord que l'inhibition de JAK2<sup>V617F</sup> par le ruxolitinib entraîne une augmentation de l'autophagie dans des lignées cellulaires et des cellules primaires de patients JAK2 mutés. De plus, inhiber l'autophagie, en combinaison avec le ruxolitinib, augmente les effets cytotoxiques du traitement dans ces cellules et réduit les capacités clonogéniques de cellules de patients atteints de NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Ceci indique que l'autophagie induite par le ruxolitinib est cytoprotectrice et participe à la résistance des cellules tumorales au traitement. De manière intéressante, l'autophagie n'est pas augmentée par le ruxolitinib dans les cellules JAK2 sauvages et son inhibition n'affecte pas la prolifération des cellules hématopoïétiques saines. Ces résultats suggèrent que l'induction d'autophagie cytoprotectrice observée sous traitement est un mécanisme de résistance propre aux cellules de NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>.

D'un point de vue mécanistique, l'induction de l'autophagie par le ruxolitinib est dépendante de la protéine phosphatase PP2A. En effet, le ruxolitinib augmente l'activité de PP2A et inhiber cette phosphatase prévient l'induction d'autophagie consécutive à l'inhibition de JAK2. De plus, cibler PP2A, comme inhiber l'autophagie, sensibilise les cellules de NMP JAK2<sup>V617F</sup> au ruxolitinib sans impacter les cellules hématopoïétiques saines.

Enfin, le rôle cytoprotecteur de l'autophagie a été validé *in vivo* dans un modèle de xéno greffe de cellules mutées pour JAK2 dans des souris NSG. Dans ce modèle, inhiber

l'autophagie en combinaison avec le ruxolitinib réduit la prise de greffe et prolonge significativement la survie des souris en comparaison au ruxolitinib seul.

En conclusion, cette étude démontre que l'autophagie ou son régulateur en amont, PP2A, représentent de nouvelles cibles thérapeutiques dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>. L'association du ruxolitinib avec des inhibiteurs de l'autophagie ou de PP2A permettrait d'améliorer l'efficacité du traitement, d'augmenter sa spécificité vis-à-vis du clone malin et améliorerait ainsi la prise en charge des patients atteints de NMP.



# **RESUMÉ EN ANGLAIS**

Myeloproliferative Neoplasms (MPN) are a group of chronic hematological malignancies characterized by excessive clonal expansion of myeloid lineage cells. The prevalent expression of the JAK2<sup>V617F</sup> mutated tyrosine kinase observed in these disorders led to the development of JAK1/JAK2 inhibitors such as ruxolitinib, now in clinical use. However, limited benefits of ruxolitinib were reported in clinics. Indeed, a majority of patients interrupt their treatment because of partial response or hematological side effects mainly due to a lack of specificity towards tumor cells. Therefore, there is a critical need for developing new therapeutic approaches to enhance MPN patient care. We thus hypothesized that autophagy, a catabolic process involved in cancer cell biology, could contribute to ruxolitinib resistance in these blood cancers.

Autophagy is a dynamic process of degradation and recycling of cell compounds. It is tightly regulated and it allows cells to adapt in response to many stresses. Over the past years, extensive data have established a close relationship between autophagy and cancer. Indeed, tumor cells are able to hijack autophagy to their own benefits to proliferate and survive in stressful environment and even to resist cancer treatments. Until now, little attention has been paid to the role of autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> MPN cells. My PhD project thus aims to characterize the involvement of autophagy in the resistance mechanisms to ruxolitinib in these cancer types.

First, my results show that JAK2<sup>V617F</sup> inhibitor ruxolitinib leads to an early autophagy flux induction in JAK2<sup>V617F</sup> cell lines and primary MPN patient cells. Furthermore, inhibiting autophagy in combination with ruxolitinib reduced proliferation and increased death of JAK2<sup>V617F</sup> cells. Accordingly, proliferation and clonogenic potential of JAK2<sup>V617F</sup>-driven primary MPN patient cells, but not of normal hematopoietic cells, were markedly impaired by the association, ruxolitinib plus autophagy inhibitors, compared to ruxolitinib alone. These results therefore indicate that ruxolitinib-induced autophagy is cytoprotective, contributes to treatment resistance of tumor cells and represents a JAK2<sup>V617F</sup> MPN cell-specific resistance mechanism.

Mechanistically, we demonstrate that ruxolitinib-induced autophagy relies on PP2A protein phosphatase activation. Indeed, ruxolitinib treatment enhances PP2A activity in JAK2<sup>V617F</sup> cells and inhibiting this phosphatase prevents the autophagy induction mediated by JAK2 inhibition. Accordingly, targeting PP2A mirrors the effects obtained with autophagy inhibitors as it sensitizes JAK2<sup>V617F</sup> cells to ruxolitinib without impacting healthy hematopoietic cells.

Finally, we confirmed the autophagy cytoprotective role *in vivo* in a xenograft model of JAK2 mutated cells into NSG mice. In this model, the duplet therapy, *i.e.* autophagy inhibitor plus ruxolitinib, reduces tumor burden and significantly extends mice overall survival compared with ruxolitinib alone.

To conclude, autophagy or its upstream regulator PP2A represent new therapeutic targets in JAK2<sup>V617F</sup>-positive MPNs. Combining ruxolitinib with autophagy or PP2A inhibitors could enhance treatment efficacy and specificity towards the malignant clone to improve MPN patient care.

# **TABLE DES MATIÈRES**



REMERCIEMENTS .....	3
RESUMÉ EN FRANÇAIS .....	9
RESUMÉ EN ANGLAIS .....	13
TABLE DES MATIÈRES .....	15
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	19
LISTE DES FIGURES.....	23
LISTE DES TABLEAUX.....	27
INTRODUCTION .....	29
I. DE L'HEMATOPOIESE NORMALE AUX HEMOPATHIES MALIGNES : .....	30
A. L'hématopoïèse normale : .....	30
B. L'hématopoïèse clonale : .....	35
C. Les néoplasies myéloprolifératives BCR-ABL1 négatives : .....	37
II. LA MUTATION JAK2 <sup>V617F</sup> : .....	42
A. La tyrosine kinase JAK2, un acteur majeur dans la régulation de l'hématopoïèse physiologique : .....	42
B. Caractérisation de la mutation JAK2 <sup>V617F</sup> : .....	50
C. Les traitements des NMP BCR-ABL1 négatives : .....	57
D. Mécanismes de résistance au ruxolitinib : .....	62
III. L'AUTOPHAGIE : .....	65
A. Généralités : .....	65
B. Les acteurs moléculaires de l'autophagie : .....	68
C. La mesure de l'autophagie : .....	74
D. Voies de signalisation régulant l'autophagie : .....	78
E. Mécanismes cellulaires régulés par l'autophagie : .....	84
F. Rôles de l'autophagie dans la myélopoïèse : .....	89
IV. L'autophagie, un processus largement étudié en cancérologie : .....	92
A. L'autophagie dans l'initiation et la progression des cancers : .....	93
B. L'autophagie dans la réponse des hémopathies malignes aux traitements : .....	96
C. L'autophagie dans la réponse au ruxolitinib des NMP exprimant JAK2 <sup>V617F</sup> : .....	98

V. La protéine phosphatase PP2A, un régulateur potentiel de l'autophagie dans les NMP :	99
A. Généralités sur PP2A :	99
B. Liens entre PP2A et la signalisation de JAK2 :	100
C. Régulation de l'autophagie par PP2A :	102
D. Rôle de PP2A dans l'érythropoïèse :	106
E. Liens entre PP2A et cancers :	106
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS.....	109
I. HYPOTHÈSE :	110
II. OBJECTIFS :	111
RÉSULTATS .....	113
I. CONTEXTE :	114
II. RÉSULTATS MAJEURS :	114
III. ARTICLE :	114
DISCUSSION ET CONCLUSION .....	153
I. DISCUSSION :	154
A. Etudier <i>in vivo</i> le caractère cytoprotecteur de l'autophagie dans des modèles murins de NMP :	154
B. Caractériser comment PP2A régule l'autophagie sous traitement au ruxolitinib :	156
C. Identifier comment l'autophagie participe aux mécanismes de résistance au ruxolitinib :	159
D. Déterminer le rôle de l'autophagie dans le développement des NMP :	165
E. Etude de l'autophagie dans la biologie des hémopathies malignes :	166
II. CONCLUSION GENERALE :	168
BIBLIOGRAPHIE .....	171



# **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

**AKT** : RAC-gamma serine/threonine-protein kinase

**AMPK** : 5' AMP-activated protein kinase

**ASXL1** : additional sex combs-like 1

**ATF2** : activating transcription factor 2

**ATF4** : activating transcription factor 4

**ATG** : autophagy-related gene

**Bcl** : B-cell lymphoma

**BCR-ABL1** : breakpoint cluster region - Abelson 1

**BFU-E** : burst forming unit - erythrocyte

**CALR** : calréticuline

**CBL** : Casitas B-lineage lymphoma

**CDC25A** : cell division cycle 25 homolog A

**C/EBP $\alpha$**  : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

**CFU** : colony forming unit

**CHIP** : hématopoïèse clonale de signification indéterminée

**CHOP** : C/EBP-homologous protein

**CIP2A** : cancerous inhibitor of PP2A

**CLP** : progéniteurs lymphoïdes communs

**CMA** : autophagie médiée par les chaperonnes

**CMH** : complexe majeur d'histocompatibilité

**CMP** : progéniteurs myéloïdes communs

**CSH** : cellules souches leucémiques

**CUX1** : cut like homeobox 1

**DNMT3A** : DNA-methyltransferase 3A

**DRAM** : damage-regulated autophagy modulator

**eIF2 $\alpha$**  : eukaryotic translation initiation factor 2A

**EPO** : érythropoïétine

**EPO-R** : récepteur à l'EPO

**ERK1/2** : extracellular signal-regulated kinases 1 & 2

**ETV6** : ETS variant transcription factor 6

**EZH2** : enhancer of zeste homolog 2

**FERM** : band 4.1, ezrin, radixin and moesin

**FIP200** : focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kD

**FLT3** : Fms-like tyrosine kinase 3

**FLT3-ITD** : FLT3 - internal tandem duplication

**FOXO3** : forkhead box protein O3

**GABARAP** : gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein

**GABARAPL1/2/3** : GABARAP-like 1/2/3

**GATA1** : GATA-binding factor 1

**G-CSF** : granulocyte - colony stimulating factor

**G-CSFR** : récepteur au G-CSF

**GM-CSF** : granulocyte-monocyte - colony stimulating factor

**GM-CSFR** : récepteur au GM-CSF

**GMP** : progéniteurs granulocyte/macrophage

**HIF** : hypoxia-inducible factor

**HP1** : heterochromatin protein 1

**HRI** : heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase

**Hsc70** : heat shock cognate 71kDa protein

**HU** : hydroxyurée

**IDH1/2** : isocitrate dehydrogenase 1/2

**IKZF1** : Ikaros zinc finger protein 1

**IL-3** : interleukine 3

**IL-6** : interleukine 6

**IFN $\alpha$**  : interféron  $\alpha$

**ISR** : réponse intégrée au stress

**IT-CSH** : CSH aux capacités intermédiaires

**JAK** : Janus kinase

**JH** : JAK homology domains

**JNK** : c-Jun amino-terminal kinases

**LAM** : leucémie aiguë myéloïde

**LAMP2A** : lysosome-associated membrane protein 2A

**LC3** : microtubule associated proteins light chain 3

**LDH** : lactate déshydrogénase

**LIR** : LC3 interacting region

**LMC** : leucémie myéloïde chronique

**LMPP** : lympho-myeloid primed progenitor

**LNK** : lymphocyte adapter protein

**LT-CSH** : CSH à long terme

**MAP3K** : MAPK kinase kinase

**MAP2K** : MAPK kinase

**MAPK** : mitogen activated protein kinase

**M-CSF** : monocyte - colony stimulating factor

**MDM2** : murine double minute 2

**MEP** : progéniteurs mégacaryocyte/erythrocyte

**MFP** : myélofibrose primaire

**MPL** : myeloproliferative leukemia virus

**MPP** : progéniteurs multipotents

**mTORC1** : mammalian target of rapamycin complex 1

**NADPH** : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

**NF1** : neurofibromin 1

**NFS** : numération formule sanguine

**NRAS** : neuroblastoma rat sarcoma virus

**NMP** : néoplasies myéloprolifératives

**PAD** : PP2A activating drugs

**PERK** : PKR-like ER kinase

**PFKB3** : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphate

**PI3K** : Phosphatidylinositol-3'-Kinase de classe I

**PI3KC3** : PI3K de classe III

**PIAS** : protein inhibitor of activated STAT protein

**PIP2** : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate

**PIP3** : phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate

**PKR** : double-stranded RNA-dependent protein kinase

**PP2A** : protéine phosphatase 2A

**PTP** : tyrosine-protein phosphatase

**PV** : polyglobulie de Vaquez

**RE** : réticulum endoplasmique

**ROS** : espèces réactives de l'oxygène

**RUNX1** : Runt-related transcription factor 1

**SCF** : stem cell factor

**SET** : inhibitor 2 of PP2A

**SF3B1** : splicing factor 3B subunit 1

**SH2** : Src Homology 2

**SMD** : syndrome myélodysplasique

**SOCS** : suppressor of cytokine signaling

**SRSF2** : serine/arginine-rich splicing factor 2

**STAT** : Signal Transducer and Activator of Transcription

**ST-CSH** : CSH à court terme

**TE** : thrombocytémie essentielle

**TET2** : Tet methylcytosine dioxygenase 2

**TFEB** : transcription Factor EB

**TP53** : tumor protein p53

**TPO** : thrombopoïétine

**TYK2** : non-receptor tyrosine-protein kinase 2

**U2AF1** : U2 auxiliary factor 35 kDa subunit  
1

**ULK1/2** : Unc-51-like kinase 1/2

**VPS15** : vacuolar protein sorting 15

**VPS34** : vacuolar protein sorting 34

**WIPI** : WD-repeat interacting with  
phosphoinositides

**Ψ-SH2** : pseudo Src Homology 2

# **LISTE DES FIGURES**



<b>Figure 1</b> : Schéma général de l'hématopoïèse.....	33
<b>Figure 2</b> : Evolution de l'hématopoïèse clonale.....	37
<b>Figure 3</b> : Structure de la protéine JAK2.....	43
<b>Figure 4</b> : Implication des kinases JAK dans la transduction du signal en aval des récepteurs de cytokines.....	44
<b>Figure 5</b> : Les principales voies de signalisation dépendantes de JAK2.....	47
<b>Figure 6</b> : Mécanisme d'action non canonique de la voie JAK2/STAT5.....	48
<b>Figure 7</b> : Expression relative de JAK2 au cours de la myélopoïèse humaine.....	49
<b>Figure 8</b> : Reprogrammations métaboliques induites par la mutation JAK2 <sup>V617F</sup> .....	53
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique des stratégies thérapeutiques identifiées pour améliorer l'efficacité du ruxolitinib dans les NMP.....	64
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique des trois types d'autophagie.....	66
<b>Figure 11</b> : Les différentes étapes de la macroautophagie.....	68
<b>Figure 12</b> : Représentation schématique des bases moléculaires de l'initiation de l'autophagie.....	70
<b>Figure 13</b> : Les systèmes d'élongation de l'autophagie.....	72
<b>Figure 14</b> : Mécanisme de fusion de l'autophagosome avec le lysosome.....	73
<b>Figure 15</b> : Principales voies décrites d'autophagie sélective.....	74
<b>Figure 16</b> : Représentation schématique du marquage de la protéine LC3 pour visualiser une accumulation d'autophagosomes par immunofluorescence.....	75
<b>Figure 17</b> : Schématisation du suivi de la conversion du LC3-I en LC3-II par western blot.....	75
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique du calcul du flux autophagique par western blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant la protéine LC3.....	76
<b>Figure 19</b> : Régulation coordonnée de l'autophagie par mTORC1 et AMPK en réponse à un stress métabolique.....	79
<b>Figure 20</b> : Régulation de l'autophagie par la voie de la réponse intégrée au stress.....	80
<b>Figure 21</b> : Régulation différentielle de l'autophagie en fonction de la localisation de STAT3.....	82
<b>Figure 22</b> : Régulation du métabolisme énergétique par autophagie.....	86
<b>Figure 23</b> : Rôle de l'autophagie dans le maintien des CSH.....	90
<b>Figure 24</b> : Schéma général du rôle de l'autophagie dans la transformation et la progression tumorale.....	92
<b>Figure 25</b> : Composition des complexes hétérotrimériques PP2A.....	100
<b>Figure 26</b> : Mécanisme de reconnaissance des protéines à motif LxxIxE par PP2A.....	100
<b>Figure 27</b> : Régulation croisée de la signalisation dépendante de JAK2 et la phosphatase PP2A.....	101
<b>Figure 28</b> : Rôle central de PP2A dans la régulation de l'autophagie.....	105
<b>Figure 29</b> : Article figure 1.....	140
<b>Figure 30</b> : Article figure 2.....	141

<b>Figure 31</b> : Article figure 3 .....	142
<b>Figure 32</b> : Article figure 4 .....	143
<b>Figure 33</b> : Article figure S1 .....	148
<b>Figure 34</b> : Article figure S2 .....	149
<b>Figure 35</b> : Article figure S3 .....	150
<b>Figure 36</b> : Article figure S4 .....	151
<b>Figure 37</b> : Etude de la combinaison du ruxolitinib avec la chloroquine in vivo dans un modèle murin de NMP JAK2 <sup>V617F</sup> .....	155
<b>Figure 38</b> : Etude de l'impact de l'inhibition de JAK2 <sup>V617F</sup> par le ruxolitinib, en combinaison ou non avec une inhibition de l'autophagie, sur la masse mitochondriale. ....	160
<b>Figure 39</b> : Etude de l'impact d'une inhibition de l'autophagie sur la signalisation oncogénique de JAK2 <sup>V617F</sup> .....	164
<b>Figure 40</b> : Mise au point d'une méthode de purification des autophagosomes dans des cellules leucémiques. ....	168
<b>Figure 41</b> : Rôle de l'autophagie dans la résistance au ruxolitinib des NMP JAK2 <sup>V617F</sup> .....	169



# **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1</b> : Liste des principales mutations dans la CHIP. ....	36
<b>Tableau 2</b> : Liste des mutations présentes dans les NMP.....	41
<b>Tableau 3</b> : Liste des principaux inhibiteurs de JAK2 développés pour le traitement des NMP. ....	59
<b>Tableau 4</b> : Liste des principaux essais cliniques basés sur une combinaison avec le ruxolitinib. ....	61
<b>Tableau 5</b> : Liste des principales protéines ATG impliquées dans la formation des autophagosomes chez les mammifères.....	69

# **INTRODUCTION**

# I. DE L'HEMATOPOIESE NORMALE AUX HEMOPATHIES MALIGNES :

## A. L'hématopoïèse normale :

### 1. Définition de l'hématopoïèse :

Avec plus de mille milliards de cellules produites chaque jour, le sang est l'un des tissus se régénérant le plus rapidement chez l'humain adulte. Cette production est assurée dans la moelle osseuse par l'hématopoïèse (du grec « *hematos* » sang et « *poiesis* » fabrication). Elle correspond à l'ensemble des événements hiérarchiques qui permettent la production et le remplacement continu et régulé des différentes cellules hématopoïétiques du sang (cellules circulantes) et des tissus (cellules résidentes) à partir d'une petite population de cellules de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cette notion a été introduite par les travaux du biologiste russe A. Maximow qui publie en 1906 sa théorie unitaire de l'hématopoïèse selon laquelle la production de l'ensemble des cellules du sang serait organisée de manière hiérarchique à partir d'une origine cellulaire commune qu'il nomma « polyblaste ».

L'hématopoïèse est donc un processus complexe possédant de fortes capacités de prolifération et de différenciation, mais elle présente aussi un haut potentiel d'adaptation. En effet, si la production cellulaire est stable dans des conditions physiologiques, elle peut être largement modifiée en réponse à différents stimuli environnementaux ou en conditions physiopathologiques. Cette grande plasticité est sous-tendue par l'existence de fins mécanismes de régulation à la fois au niveau endo- et paracrine par les cytokines et au niveau cellulaire par les facteurs de transcription.

### 2. La niche hématopoïétique :

Chez l'adulte, l'hématopoïèse a lieu essentiellement dans la moelle osseuse des os de la tête, des vertèbres, du thorax, du bassin et dans les épiphyses des os longs. La moelle osseuse est composée essentiellement de cellules hématopoïétiques, d'une innervation par le système nerveux sympathique, d'un réseau microvasculaire riche et d'un ensemble de cellules stromales qui forment le cadre osseux et produisent la matrice extracellulaire ainsi que des facteurs de croissance hématopoïétiques. C'est ce microenvironnement, comprenant l'ensemble des cellules stromales, la matrice et les signaux qu'elles produisent, qui forme la niche hématopoïétique. Il s'agit d'un réseau dynamique en étroite interrelation avec les CSH

pour permettre leur maintien et leur développement et ainsi assurer le déroulement de l'hématopoïèse tout au long de la vie de l'individu.

### 3. La hiérarchie hématopoïétique :

Dans sa définition classique, l'hématopoïèse correspond à un système hiérarchique qui peut être divisé en quatre compartiments en fonction du degré de maturité des cellules : les cellules souches, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Cependant, l'arrivée de nouvelles technologies permettant l'étude à l'échelle de la cellule unique a conduit à une redéfinition de la hiérarchie hématopoïétique. Aujourd'hui, cette hiérarchie est visualisée comme un continuum de différenciation où la démarcation entre les différentes populations est réduite. De plus, ces études ont mis en évidence une grande hétérogénéité au sein de chaque compartiment immature en termes de possibilités de différenciation et donc l'existence de biais de lignages acquis précocement dans la hiérarchie hématopoïétique (Laurenti and Göttgens, 2018).

#### *a. Les cellules souches :*

Les CSH correspondent au compartiment le plus immature situé à l'apex de la hiérarchie hématopoïétique. Plusieurs études ont tenté de définir les CSH, ce sont des cellules rares et quiescentes qui présentent une autophagie élevée (Warr et al., 2013; Ho et al., 2017) et un métabolisme essentiellement glycolytique (Takubo et al., 2013). L'identification des CSH passe également par une définition fonctionnelle, ces cellules présentent des capacités multiples de différenciation et d'auto-renouvellement. La démonstration de leurs fonctions provient des travaux de Till et McCulloch qui, après injection de cellules de moelle de souris saines, décrivent l'apparition de nodules de divers lignages hématopoïétiques dans les rates des souris receveuses préalablement mises en aplasie médullaire par irradiation létale (Becker et al., 1963). Ces observations démontrent l'existence dans la moelle osseuse de cellules multipotentes capables de régénérer l'ensemble des lignages hématopoïétiques après transplantation.

Il apparaît aujourd'hui que les CSH sont une population de cellules hétérogènes que l'on peut classer en fonction de leurs capacités d'auto-renouvellement et de différenciation. D'une part, les CSH dites à long terme (LT-CSH) présentent des capacités élevées d'auto-renouvellement. D'autre part, les CSH à court terme (ST-CSH) possèdent des capacités d'auto-renouvellement plus faibles. Une population de CSH aux capacités intermédiaires (IT-CSH) a également été décrite à l'interface entre LT-CSH et ST-CSH (Figure 1). Ce sont des cellules quiescentes à l'état basal qui sont réactivées par des stimuli de stress. Les CSH contribuent donc peu à la production quotidienne de cellules hématopoïétiques, elles servent cependant de réservoir en cas de lésion.



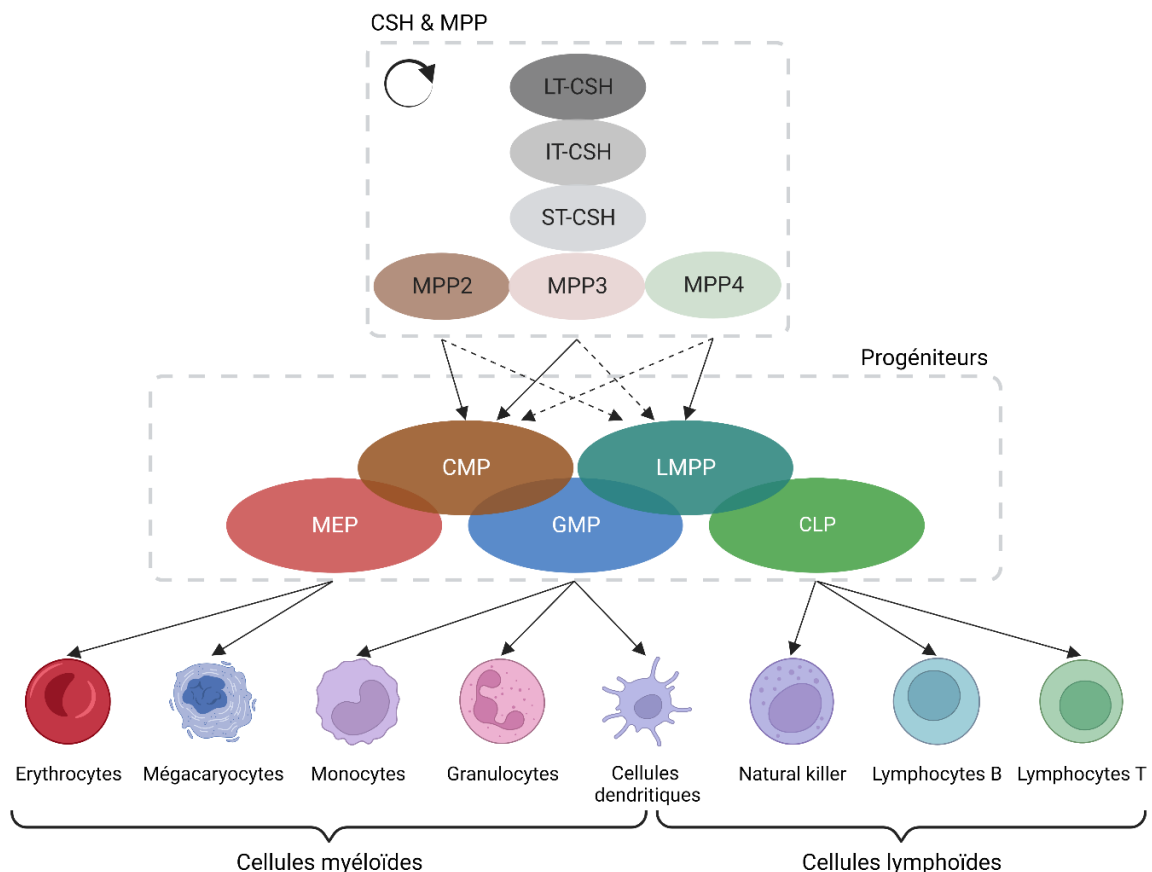
Initialement positionnés en aval dans la hiérarchie hématopoïétique, les progéniteurs multipotents (MPP) apparaissent étroitement liés à la population des CSH. Ces cellules, qui présentent des capacités d'auto-renouvellement, assurent à l'état basal l'essentiel de la production quotidienne de cellules hématopoïétiques. Sur la base d'études récentes, les MPP apparaissent comme un groupe hétérogène où chaque cellule présente individuellement un biais de différenciation dans une voie hématopoïétique spécifique, ils peuvent être séparés en MPP1, MPP2, MPP3 et MPP4 (Figure 1). Les MPP1 sont des cellules multipotentes fonctionnellement proches des ST-CSH. Les MPP2 et MPP3 s'engagent préférentiellement dans la voie de différenciation myéloïde alors que les MPP4 plutôt vers la voie lymphoïde (Pietras et al., 2015). La représentation classique de l'hématopoïèse était basée sur un engagement des cellules en aval des MPP dans l'une des deux voies de différenciation hématopoïétiques que sont les lignées myéloïde et lymphoïde. Ces découvertes ont révélé l'existence de choix de trajectoires de différenciation dès les stades les plus immatures de l'hématopoïèse. Le processus de différenciation d'une cellule sanguine particulière serait donc dépendant d'un biais de différenciation apparu dès le stade des CSH.

#### *b. Les progéniteurs :*

Plus en aval, les cellules perdent peu à peu leurs capacités d'auto-renouvellement et augmentent leurs capacités de prolifération et de différenciation pour donner des progéniteurs. C'est au sein de ces populations qu'émergent les premières marques phénotypiques d'un engagement dans l'une ou plusieurs des voies de différenciation hématopoïétiques. La ségrégation des voies de différenciation se poursuit d'une part avec, en aval des MPP2 et 3, les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) qui possèdent exclusivement des capacités de différenciation dans la voie myéloïde vers les progéniteurs mégacaryocyte/érythrocyte (MEP) ou les progéniteurs granulocyte/macrophage (GMP). En parallèle, les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) en aval des MPP4 possèdent exclusivement des capacités de différenciation lymphoïde (Figure 1). Cette vision a cependant été complexifiée par la mise en évidence d'états transitoires à l'origine de la notion de continuum de différenciation. Ainsi les progéniteurs hématopoïétiques seraient un compartiment hautement hétérogène que les CSH et MPP en cours de différenciation traversent pour acquérir graduellement les caractéristiques d'un type de lignage spécifique (Buenrostro et al., 2018).

Le modèle de ségrégation en deux lignages a également été remis en cause par la découverte de progéniteurs aux capacités doubles de différenciation à la fois dans les voies myéloïde et lymphoïde ou LMPP (« lympho-myeloid primed progenitor »), suggérant que ces deux trajectoires de différenciation pouvaient également rester intriquées en aval des MPP (Figure 1).

Historiquement, l'identification des progéniteurs a été permise par la mise au point d'un test fonctionnel *in vitro* de culture en milieu semi-solide appelé test de clonogénicité (Bradley and Metcalf, 1966). Ce test évalue la capacité des cellules à proliférer pour former des clones engagés dans une voie de différenciation dont la nature sera dépendante du type de progéniteur qui en est à l'origine. Ainsi, le CLP sera identifiable par sa capacité à former des clones, aussi appelés « Colony Forming Unit » (CFU), dans les lignages des lymphocytes B, lymphocytes T et cellules Natural Killer. Le CMP, aussi appelé CFU-GEMM (« Granulocyte Erythrocyte Macrophage Megakaryocyte ») donnera des progéniteurs engagés de type CFU-GM (Granulocyte Macrophage) dans la voie granulo-monocytaire, BFU-Meg (Burst forming unit – Megakaryocyte) de la lignée mégacaryocytaire et de type BFU-E (BFU-Erythrocyte) engagés dans la différenciation érythroïde. Les BFU-E sont aisément reconnaissables par leur capacité à former des colonies éclatées d'une coloration rouge-orangée caractéristique de la production d'hémoglobine par les cellules de la lignée érythroïde.



**Figure 1 : Schéma général de l'hématopoïèse.**

Les cellules du sang dérivent du compartiment des CSH et MPP qui présentent des biais de différenciation spécifiques de différents lignages. La différenciation hématopoïétique est un processus continu, les cellules engagées dans le compartiment des progéniteurs vont acquérir peu à peu des caractéristiques propres à un seul type cellulaire. Le bon déroulement de la myélopoïèse est finement régulé par un ensemble de cytokines qui stimulent la prolifération et la survie des cellules ou leur différenciation.

### *c. Les précurseurs et cellules matures :*

Au cours des cycles de divisions cellulaires, les progéniteurs perdent leur potentiel de différenciation et de prolifération pour devenir des précurseurs spécifiques d'une seule lignée de l'hématopoïèse, capables de générer un type de cellules matures. Les précurseurs suivent alors un processus de maturation pour acquérir progressivement une morphologie identifiable ainsi qu'une fonction propre à chaque type cellulaire. Enfin, lors d'une étape de mobilisation, les cellules sortent de la moelle osseuse et migrent vers le sang périphérique où elles pourront exercer leurs fonctions ou rejoindre d'autres tissus.

L'ensemble des processus menant de la CSH aux cellules myéloïdes matures est appelé myélopoïèse. Elle peut être séparée en érythropoïèse (production des globules rouges), mégacaryopoïèse (production des plaquettes), granulopoïèse (production des granulocytes) et monocytopoïèse (production des monocytes-macrophages).

### **4. Régulation de la myélopoïèse par les cytokines :**

La quantité de cellules sanguines doit être continuellement maintenue dans des valeurs physiologiques pour éviter la survenue de pathologies. Cependant, elle doit également être rapidement et transitoirement adaptable pour répondre à divers stress comme des infections ou des saignements. Ainsi, une régulation fine de l'hématopoïèse est un enjeu majeur pour l'organisme. Celle-ci est largement médiée par un ensemble de facteurs solubles appelés cytokines ou facteurs de croissance hématopoïétiques.

En fonction de leur niveau d'action dans la hiérarchie hématopoïétique, les cytokines peuvent être classées en trois catégories. Premièrement, les facteurs de promotion qui interviennent en amont dans l'hématopoïèse en régulant la prolifération, la survie, l'entrée en cycle et l'auto-renouvellement des CSH. Les principaux facteurs de promotion sont le stem cell factor (SCF), l'interleukine 3 (IL-3) et la famille des interleukines 6 (IL-6). Puis, les cytokines de la catégorie des facteurs de régulation multipotents comme le granulocyte-monocyte – colony stimulating factor (GM-CSF) qui régulent la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules de divers lignages à des étapes précoces. Enfin, les étapes les plus tardives de la différenciation de lignées déjà engagées sont contrôlées par les facteurs de régulation dits restreints. Ainsi, le G-CSF stimule la production des granulocytes, le M-CSF favorise la production des monocytes, la thrombopoïétine (TPO) permet la production des plaquettes et l'érythropoïétine (EPO) contrôle la production des érythrocytes.

### **5. Dérégulations de la myélopoïèse :**

Des dérégulations de la myélopoïèse peuvent conduire à une production insuffisante de cellules sanguines, on parle alors de cytopénie. Au contraire, une dérégulation à la hausse

entraîne un excès de production de cellules, on parle alors de leucocytose pour les globules blancs, de thrombocytose lorsque les plaquettes sont produites en trop grand nombre ou de polyglobulie lorsque c'est l'érythropoïèse qui est exacerbée.

Les causes de ces dérégulations sont multiples comme des facteurs environnementaux, des carences ou des maladies. Par ailleurs, elles peuvent être dues à des facteurs intrinsèques propres à la cellule comme la survenue de mutations. Si une mutation est retrouvée dans des cellules très immatures comme les CSH ou les MPP, elle conduit à la formation d'un clone de cellules qui prolifèrent et se différencient parallèlement à l'hématopoïèse normale. On parle alors d'hématopoïèse clonale. Dans certains cas la mutation confère un avantage à ce clone qui prolifère alors de manière dérégulée et remplace peu à peu l'hématopoïèse normale, pouvant conduire à l'apparition de cancers ou hémopathies malignes.

## **B. L'hématopoïèse clonale :**

### **1. Définition de l'hématopoïèse clonale :**

Avec l'âge, l'accumulation de mutations au sein des CSH ou des MPP conduit à l'expansion de clones de cellules hématopoïétiques génétiquement hétérogènes. La plupart des mutations n'ont pas d'impact biologique, cependant certaines confèrent un avantage prolifératif aux clones qui vont alors progressivement s'amplifier au détriment des autres. L'identification de ce processus chez des individus sans hémopathie maligne, présentant une hématopoïèse qui reste fonctionnellement normale, est nommée hématopoïèse clonale de signification indéterminée ou CHIP (« clonal hematopoiesis of indeterminate potential ») (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014; Xie et al., 2014). Les gènes communément retrouvés mutés dans la CHIP sont habituellement associés au développement d'un cancer hématologique. Des études multivariées menées sur de larges cohortes de patients indiquent que les individus présentant une CHIP ont un risque accru de développer une hémopathie maligne. De ce fait, la 5<sup>ème</sup> édition de la classification des tumeurs hématologiques de l'Organisation Mondiale de la Santé à paraître en fin d'année 2022 définit la CHIP comme étant un état précurseur de maladies hématologiques (Khoury et al., 2022). Les progrès de la biologie moléculaire avec notamment l'avènement des techniques de séquençage à haut débit ont permis d'identifier ces mutations somatiques même si celles-ci sont peu exprimées dans les cellules sanguines de sujets sains. Aujourd'hui, une mutation est comptabilisée comme définissant une CHIP si elle est retrouvée avec un seuil de détection (ou fréquence allélique) arbitrairement fixé à 2% des cellules hématopoïétiques. Dans 90% des sujets atteints de CHIP, c'est une seule mutation qui est retrouvée de manière isolée. Par ailleurs, bien que la CHIP soit très rare chez les moins de 40 ans, son incidence augmente avec l'âge jusqu'à être retrouvée chez plus de 10% des sujets de 70 ans et plus, ce qui fait de l'âge le principal facteur de risque d'une CHIP.

## 2. Paysage mutationnel de l'hématopoïèse clonale :

Mutation	Fréquence dans la CHIP	Mécanisme affecté	Hémopathies malignes associées
DNMT3A	53%	Régulation épigénétique	LAM - SMD - NMP - Lymphomes
TET2	10%		LAM - SMD - NMP - LMMC - Mastocytoses
ASXL1	9%		LAM - SMD - NMP - LMMC - Mastocytoses
JAK2	5%	Signalisation	NMP - LAMC - LAL
TP53	4%	Régulation de l'apoptose	LAM - SMD - NMP
SF3B1	4%	Epissage des ARNm	LAM - SMD - NMP

**Tableau 1 : Liste des principales mutations dans la CHIP.**

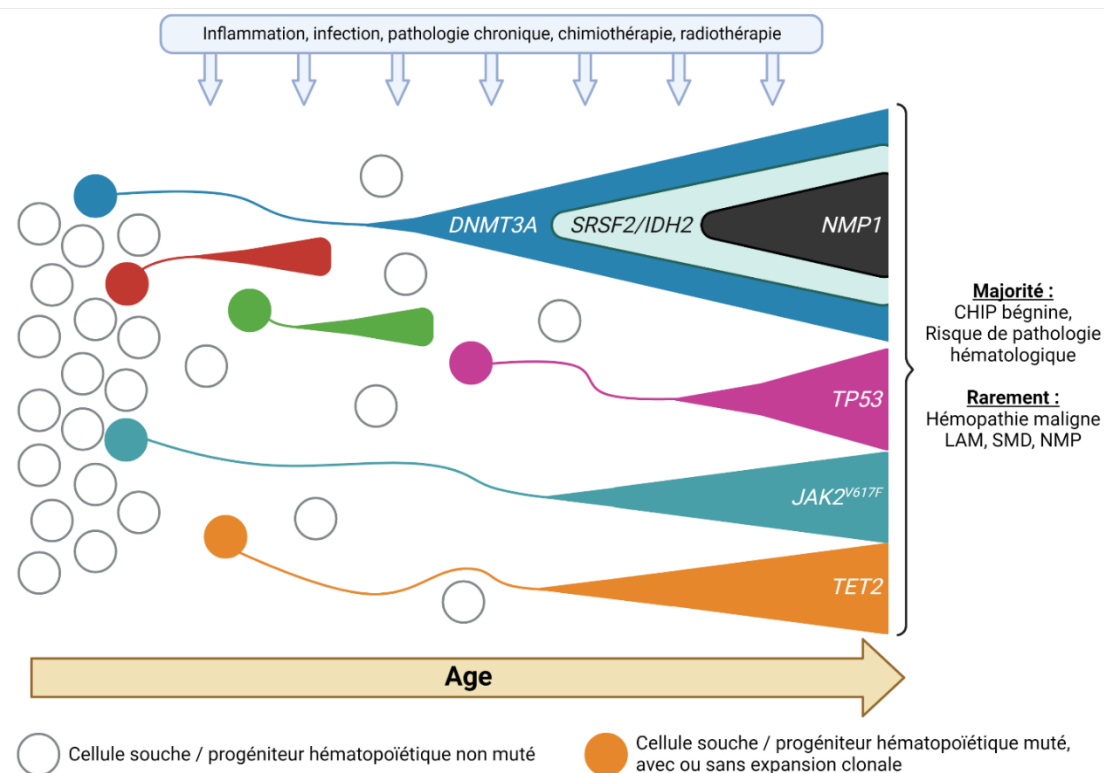
Abréviations : LAM (leucémie aiguë myéloïde), SMD (syndrome myélodysplasique), NMP (néoplasies myéloprolifératives), LMMC (leucémie myélomonocytaire chronique), LAMC (leucémie aiguë mégacaryoblastique), LAL (leucémie aiguë lymphoïde).

Les mutations initialement recherchées dans la CHIP sont celles affectant une liste de 160 gènes qui avaient précédemment été retrouvés comme mutés de manière récurrente dans les cancers hématologiques (Tableau 1). Les gènes principalement identifiés comme mutés dans le contexte d'une CHIP sont *DNMT3A* (« DNA-méthyltransférase 3A ») dans 53% des cas, *TET2* (« tet méthylcytosine dioxygénase 2 ») dans 10% des cas, *ASXL1* (« additional sex combs-like 1 ») dans 9% des cas et *JAK2* (« Janus kinase 2 ») dans 5% des cas. *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* sont des protéines impliquées dans la régulation épigénétique de l'ADN. *JAK2* est une protéine kinase essentielle à la signalisation de cytokines contrôlant l'hématopoïèse. La présence de ces mutations procure un avantage prolifératif et permet l'expansion clonale des cellules qui les portent (Watson et al., 2020). Bien que cet avantage soit modéré, il contribue à l'expansion clonale de la CHIP qui associée à l'âge et à l'émergence potentielle de nouvelles mutations au sein d'un même clone conduisent au développement de cancers hématologiques.

## 3. Progression en hémopathie maligne :

La présence d'une CHIP est associée à un risque accru de développement d'une hémopathie maligne estimé à 0,5-1% par an (Genovese et al., 2014; Jaiswal et al., 2014). Les mutations présentes dans le clone malin sont alors celles retrouvées dans le clone de CHIP duquel il émerge, accompagnées généralement de nouvelles mutations. Ceci renforce l'hypothèse selon laquelle la CHIP crée un terrain favorable à l'apparition de nouvelles mutations qui pourront être l'élément déclencheur d'une hémopathie maligne. Il existerait donc

un continuum entre les cancers hématologiques et les clones sains, tels que dans la CHIP, desquels ils dérivent. En revanche, le type d'hémopathie développée à partir d'une CHIP n'est pas déterminé. Dans le cas des affections myéloïdes, il peut s'agir principalement de syndromes myélodysplasiques, de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ou de néoplasies myéloprolifératives (NMP) (Figure 2).



**Figure 2 : Evolution de l'hématopoïèse clonale.**

La survenue de mutations dans les CSH peut entraîner l'émergence d'un clone au sein de l'hématopoïèse. Bien que ce clone soit généralement asymptomatique, il peut favoriser l'accumulation de nouvelles mutations et progresser vers une hémopathie maligne (adapté de Danlos et al., 2019).

## C. Les néoplasies myéloprolifératives BCR-ABL1 négatives :

### 1. Classification des NMP :

Les NMP correspondent à un groupe d'hémopathies malignes chroniques de faible incidence définies par une expansion clonale excessive de cellules de la lignée myéloïde sans blocage de différenciation. La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une NMP qui se distingue des autres par la présence du chromosome de Philadelphie. Cette anomalie chromosomique causée par une translocation réciproque t(9 ; 22) conduit à la production de la protéine de fusion BCR-ABL1 (« breakpoint cluster region – Abelson 1 »), une tyrosine kinase dérégulée responsable d'une granulopoïèse exacerbée et de la survenue de la maladie. Selon la classification actualisée des tumeurs hématologiques (Khoury et al., 2022),

les NMP dites BCR-ABL1 négatives regroupent trois principales pathologies que sont la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primaire (MFP). Ce groupe comprend également d'autres pathologies plus rares dites atypiques comme la leucémie neutrophile chronique, la leucémie éosinophile chronique, la leucémie myélomonocytaire juvénile ainsi que les NMP non classifiées. Dans la suite du mémoire, le terme NMP fera référence aux seules PV, TE et MFP.

## 2. La polyglobulie de Vaquez :

La polyglobulie de Vaquez (PV) ou polyglobulie primitive est caractérisée par une production accrue de cellules myéloïdes morphologiquement normales avec une prédominance sur la lignée érythrocytaire. Cette production exacerbée de globules rouges est indépendante des taux circulants d'EPO. En effet, les progéniteurs issus de patients atteints de PV sont capables de proliférer en milieu semi-solide et de donner des clones érythroïdes de type BFU-E indépendamment de cette cytokine.

C'est la plus fréquente des NMP, son incidence est estimée de 1 à 2,8 nouveaux cas pour 100.000 personnes par an et augmente avec l'âge. L'âge moyen au diagnostic est d'environ 60 ans. Il repose principalement sur la détection d'une polyglobulie sur la numération formule sanguine (NFS), un dosage de l'EPO ainsi qu'une exploration pour la recherche de mutations notamment de *JAK2*. Il s'agit d'un cancer chronique, en effet la survie médiane des patients atteints de PV est de 24 ans.

La PV est souvent asymptomatique, mais l'accumulation d'érythrocytes dans le sang aboutit finalement à une hypervolémie et une hyperviscosité sanguine. Les conséquences pour le patient sont multiples comme une asthénie, des céphalées, une érythrose cutanée ou un prurit à l'eau. Environ un tiers des patients présentent également une augmentation du volume de la rate ou splénomégalie.

Les complications de la PV à court terme sont essentiellement un risque de thromboses artérielles ou veineuses en raison de l'augmentation de la viscosité sanguine ainsi qu'une prédisposition à une augmentation de l'importance des hémorragies. À plus long terme, 10 à 30% des patients développent une insuffisance médullaire et une myélofibrose. Une transformation en LAM peut spontanément survenir dans 1 à 2,5% des cas.

## 3. La thrombocytémie essentielle :

La thrombocytémie essentielle (TE) se caractérise par une production accrue de cellules myéloïdes avec une prédominance sur la lignée mégacaryocytaire.

Son incidence est estimée de 1 à 2,5 nouveaux cas pour 100.000 personnes par an et augmente avec l'âge. Le diagnostic est le plus souvent réalisé après 50 ans, un pic précoce de survenue de la maladie est également observé autour de 30 ans principalement chez les

femmes. Le diagnostic repose principalement sur l'observation d'une numération plaquettaire élevée et persistante et l'exploration pour la recherche de mutations. Il s'agit également d'un cancer chronique puisque la survie médiane des patients atteints d'une TE est quasiment similaire à la population générale.

À l'instar de la PV, la TE se développe lentement et peut rester longtemps asymptomatique. Elle cause progressivement une asthénie, des céphalées, des rougeurs, des sensations de brûlure dans les extrémités et également une splénomégalie.

La surproduction de plaquettes augmente progressivement le risque de thromboses ou de saignements. A plus long terme, une évolution en myélofibrose ou en LAM peut également être observée mais survient plus rarement que dans la PV.

#### 4. La myélofibrose primaire :

La myélofibrose primaire (MFP) correspond à une fibrose médullaire généralement associée à une hématopoïèse extramédullaire le plus souvent splénique. Elle est la résultante d'une prolifération accrue de cellules progénitrices myéloïdes. Dans ce contexte, les mégacaryocytes qui dérivent de ces progéniteurs malins produisent de grandes quantités de cytokines (e.g. TGF-beta). Ils activent alors les fibroblastes de la moelle osseuse qui produisent des quantités excessives de matrice extracellulaire et conduisent à la fibrose médullaire. La moelle osseuse fibrosée s'appauvrit, elle perd peu à peu sa cellularité et sa capacité à héberger une hématopoïèse physiologique. Elle est alors progressivement remplacée par d'autres organes (essentiellement le foie et la rate) pour produire les cellules sanguines.

L'incidence de la MFP est estimée de 0,5 à 1,5 nouveaux cas pour 100.000 personnes par an. Le diagnostic, réalisé généralement autour de 60 ans, repose principalement sur la détection d'une fibrose par biopsie ostéo-médullaire, d'une anémie s'aggravant avec le temps par NFS, d'une splénomégalie ainsi que sur l'exploration mutationnelle.

C'est la plus agressive des NMP pour le patient, la survie médiane est de 5 à 6 ans mais présente une grande variabilité. En effet, la MFP progresse rapidement chez certains patients pour aboutir à une insuffisance médullaire ou une transformation en LAM qui engage le pronostic vital du patient. Cependant, la plupart des patients ont une évolution lente, la splénomégalie apparaît progressivement et on observe plus tardivement une dégradation de l'état général, de la fièvre et un infarctus splénique.

#### 5. Bases génétiques des NMP BCR-ABL1 négatives :

En 2005, l'identification de la première anomalie moléculaire « *driver* » retrouvée dans 70% des NMP BCR-ABL1 négatives, la mutation JAK2<sup>V617F</sup>, a constitué une avancée majeure dans la compréhension de la physiopathologie de ces maladies (Baxter et al., 2005; James et al.,



2005; Kralovics et al., 2005; Levine et al., 2005). La présence de cette mutation conduit à une activation constitutive de JAK2, une tyrosine kinase cytosolique essentielle à la signalisation des cytokines. Cette mutation est présente dans 95% des PV et dans 50 à 60% des TE et MFP.

Par la suite d'autres mutations majoritaires dans les NMP ont été identifiées (Vainchenker and Kralovics, 2017). Dans 3% des PV, on peut retrouver une mutation sur l'exon 12 de *Jak2* qui conduit à l'activation constitutive de cette tyrosine kinase. Par ailleurs, des mutations faux-sens touchant le récepteur à la thrombopoïétine MPL (« myeloproliférative leukemia virus ») ont été associées au développement d'une NMP. Elles conduisent à l'activation spontanée de la signalisation de JAK2 en aval du récepteur indépendamment de la fixation d'une cytokine. Une mutation de MPL est retrouvée dans 2 à 3% des TE et 3 à 5% des MFP. Enfin, des mutations affectant le gène codant pour la calréticuline (CALR), une protéine chaperonne responsable de la maturation et du trafic de MPL jusqu'à la membrane plasmique, ont été retrouvées dans 20 à 25% des TE et 25 à 30% des MFP. Une mutation de CALR entraîne sa liaison au domaine extracellulaire du récepteur MPL dans le réticulum endoplasmique (RE). Ceci cause la dimérisation du MPL immature et son transport *via* l'appareil de Golgi à la surface de la cellule où il sera constitutivement activé, stimulant ainsi la signalisation de JAK2 en aval du récepteur (Pecquet et al., 2019).

Les trois mutations décrites jusqu'à présent sont le plus souvent mutuellement exclusives. En revanche, elles ne permettent pas à elles seules d'expliquer l'hétérogénéité retrouvée dans les NMP. D'autres mutations ont également été identifiées dans les NMP et peuvent être classées en quatre catégories (Tableau 2) :

- les mutations affectant des voies de signalisation comme celles conduisant à une perte de fonction de régulateurs négatifs de signaux dépendants des récepteurs de cytokines (CBL, LNK) ou des mutations activatrices de signalisation (NRAS, NF1, FLT3). Ces mutations peuvent prédisposer au développement d'une NMP mais aussi favoriser la progression de la maladie et notamment la transformation en LAM.

- celles impactant la régulation épigénétique de l'expression des gènes en contrôlant la méthylation de l'ADN (TET2, DNMT3A, IDH1/2) ou la modification des histones (EZH2, ASXL1). Ces mutations, retrouvées pour certaines dans l'hématopoïèse clonale ou CHIP, auraient un rôle favorisant l'initiation de la maladie.

- les mutations de facteurs de transcription (TP53, CUX1, IKZF1, ETV6, RUNX1), qui apparaissent généralement tardivement et favorisent la transformation en LAM.

- les mutations de facteurs d'épissage (SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2), essentiellement restreintes à la TE et à la MFP, qui participeraient essentiellement à la progression de la maladie.

Ces nouvelles mutations ne sont pas restreintes aux NMP, elles peuvent être retrouvées dans la CHIP mais aussi dans les syndromes myélodysplasiques et les LAM, sous-entendant l'existence d'un continuum entre ces différents états.

Mutation	Type de mutation	Fonction	Fréquence	Conséquences
<b>Mutation « driver »</b>				
JAK2	V617F	Transduction du signal de cytokines	95% PV 50 à 60% TE et MFP	Augmentation myélopoïèse
	Exon 12		3% PV	Augmentation érythropoïèse
MPL	Faux sens	Récepteur de la TPO	3 à 5% TE et MFP	Augmentation mégacaryopoïèse
CALR	Indel exon 9	Chaperonne du RE	25% TE et MFP	
<b>Mutations secondaires</b>				
LNK	Perte de fonction	Régulateur négatif de JAK2	1 à 2% TE et MFP	Synergie avec JAK2 <sup>V617F</sup>
CBL			4% MFP	
NRAS	Activation	Voie des MAPK	Rare MFP	Progression en LAM
NF1	Faux sens - Délétion			
FLT3	FLT3-ITD (gain de fonction)	Récepteur de cytokine	<3% PV, TE et MFP	
TET2	Perte de fonction	Régulation épigénétique	10 à 20% PV, TE et MFP	Initiation et progression de la maladie
DNMT3A			5 à 10% PV, TE et MFP	
ASXL1			25% MFP, 1 à 3% PV et TE	
EZH2			5 à 10% MFP	
IDH1/2			1 à 3% MFP	
TP53	Perte de fonction	Contrôle de l'apoptose	<5% PV, TE et MFP	Progression en LAM
CUX1			<3% PV, TE et MFP	
IKZF1	Délétion – Indel	Facteur de transcription hématopoïèse	<3% PV, TE et MFP	
ETV6	Faux sens – Indel			
RUNX1	Perte de fonction			
SRSF2	Faux sens	Facteurs d'épissage de l'ARN	10 à 15% MFP, <2% TE	Initiation et progression de la maladie
SF3B1			<3% TE	Anémie
U2AF1			10 à 15% MFP	

**Tableau 2 : Liste des mutations présentes dans les NMP.**

(Adapté de Vainchenker and Kralovics, 2017).

Il apparaît qu'une large majorité des patients atteints de NMP présente une mutation responsable d'une activation constitutive de la signalisation dépendante de la protéine kinase JAK2. De plus, la mutation V617F de JAK2 est la mutation la plus fréquente dans ce groupe de cancers.

## II. LA MUTATION JAK2<sup>V617F</sup> :

### A. La tyrosine kinase JAK2, un acteur majeur dans la régulation de l'hématopoïèse physiologique :

#### 1. Généralités sur les kinases JAK :

Les cytokines exercent leurs fonctions en se fixant à la surface des cellules hématopoïétiques sur les protéines de la superfamille des récepteurs de cytokines. Cependant, cette famille de récepteurs est caractérisée notamment par une absence d'activité catalytique intrinsèque. La transduction du signal vers l'intérieur de la cellule est donc assurée par l'association des récepteurs de cytokines dans leur domaine intracellulaire avec des protéines à activité tyrosine kinase de la famille des Janus kinases (JAK). Le complexe ainsi formé permet à la cellule de transformer des signaux provenant de leur environnement en effets biologiques, conférant alors aux kinases JAK un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse.

Les membres de la famille des kinases JAK sont au nombre de quatre : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (« Non-receptor tyrosine-protein kinase 2 »). A l'exception de JAK3, préférentiellement retrouvée dans les cellules hématopoïétiques et endothéliales, les kinases JAK sont exprimées à des niveaux comparables dans une vaste majorité de types cellulaires. Elles sont impliquées dans la régulation de divers processus physiologiques, dans le développement et la croissance. De plus, une activation aberrante de la signalisation dépendante des kinases JAK est fréquemment retrouvée dans diverses pathologies comme des affections inflammatoires, des maladies auto-immunes ou des cancers. Plus particulièrement, des altérations génétiques conduisant à l'activation constitutive de voies de signalisation dépendantes de kinases JAK sont fréquemment associées au développement de cancers touchant les cellules de la lignée myéloïde (Vainchenker et al., 2018). De par son rôle prépondérant dans divers cancers, JAK2 est la plus étudiée des kinases JAK.

#### 2. Structure de JAK2 :

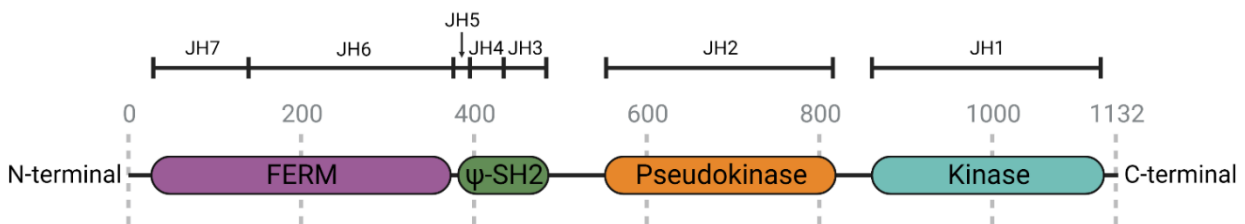
À l'instar des autres kinases JAK, JAK2 possède sept domaines d'homologie appelés domaines JH pour « JAK homology domains » classés de JH1 à JH7 (Vainchenker et al., 2018) (Figure 3) :

- Parmi eux, le domaine tyrosine kinase JH1 situé en C-terminal porte l'activité catalytique de JAK2.

- Plus en amont, le domaine pseudokinase JH2 régule l'activité kinase de JAK2 à différents niveaux. Premièrement, le domaine JH2 permet par un mécanisme d'autophosphorylation qui

inhibe le domaine JH1 de maintenir l'activité basale de JAK2 à un bas niveau (Ungureanu et al., 2011). De plus, un travail récent basé sur une technique de microscopie à fluorescence à l'échelle de la molécule unique suggère que le domaine pseudokinase de JAK2 contribue à la stabilisation des complexes de signalisation formés par JAK2 et son récepteur associé (Wilmes et al., 2020). Le domaine pseudokinase JH2 apparait donc essentiel à la régulation des mécanismes de transduction du signal dépendants de JAK2.

- En N-terminal, les domaines JH3 à JH7 comprennent un domaine pseudo Src Homology 2 ( $\Psi$ -SH2) et un domaine band 4.1, ezrin, radixin and moesin (FERM) qui permettent la liaison spécifique non-covalente de la kinase JAK avec le récepteur aux cytokines.



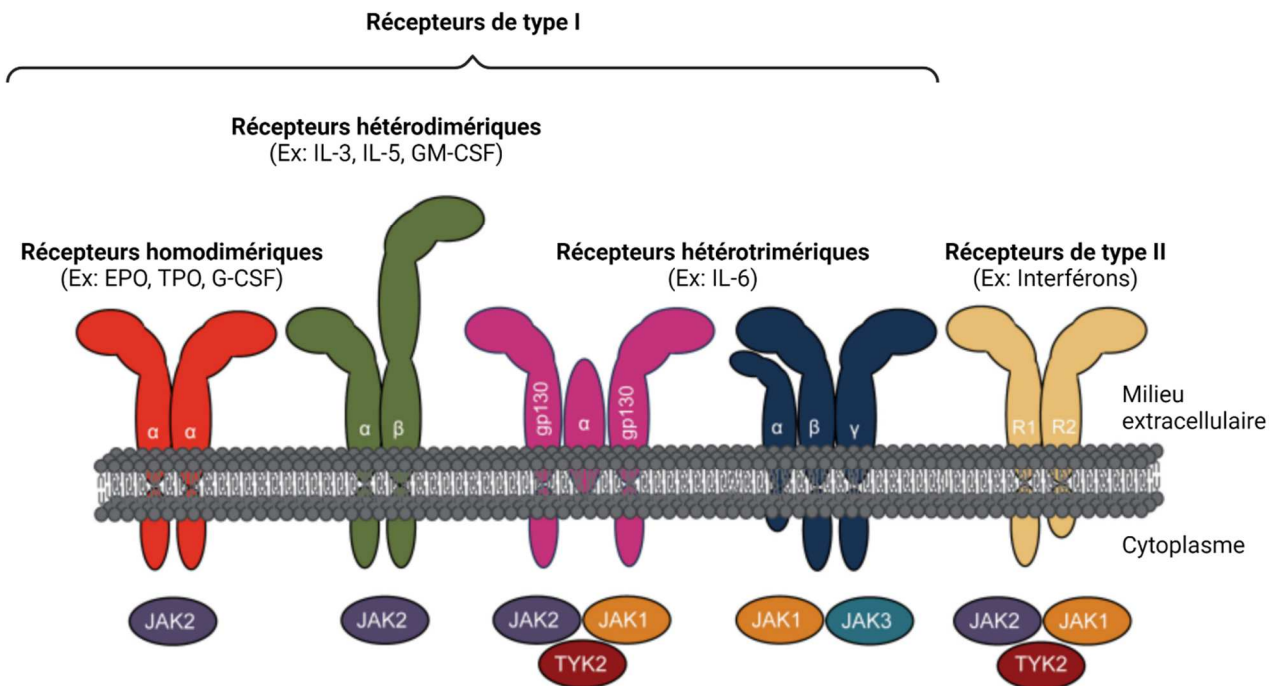
**Figure 3 : Structure de la protéine JAK2.**

La protéine kinase JAK2 est constituée de quatre domaines. Les domaines FERM et  $\Psi$ -SH2 permettent sa liaison aux récepteurs de cytokines. Le domaine kinase porte l'activité catalytique de JAK2. Le domaine pseudokinase régule le domaine kinase par un mécanisme d'autophosphorylation.

### 3. La signalisation dépendante de JAK2 :

#### *a. Les récepteurs de cytokines de type I et II :*

Le contrôle de la myélopoïèse par les cytokines est dépendant de la fixation de celles-ci sur des récepteurs de cytokines situés à la membrane plasmique. Ils peuvent être classés en récepteurs de type I ou de type II sur la base d'homologies dans leur domaine extracellulaire. Parmi ceux de type I, qui présentent des résidus cystéine et un motif WSXWS conservés, les récepteurs sont classés en différentes sous-familles en fonction du type de dimérisation lors de leur activation (homodimères, hétérodimères ou multimères). Les récepteurs de cytokines ont chacun une affinité particulière pour une ou plusieurs kinases de la famille JAK. Ainsi, les récepteurs homo- et hétérodimériques de type I, comme le récepteur à l'EPO (EPO-R), à la TPO (MPL), au G-CSF (G-CSFR) ou au GM-CSF (GM-CSFR) se lient presque exclusivement à JAK2. À l'inverse, les récepteurs multimériques de type I et les récepteurs de cytokines de type II utilisent une ou plusieurs des quatre kinases JAK dans diverses combinaisons (Ihle, 1995; Vainchenker et al., 2018) (Figure 4).



**Figure 4 : Implication des kinases JAK dans la transduction du signal en aval des récepteurs de cytokines.** Les différentes classes de récepteurs requièrent des kinases JAK spécifiques pour activer des cascades de signalisation suite à la fixation des cytokines comme celles citées entre parenthèses. JAK2 est essentiel à la signalisation de cytokines liant des récepteurs homo- et hétérodimériques comme l'EPO, la TPO ou le GM-CSF.

Dans les premières étapes des mécanismes de transduction du signal, la fixation d'une cytokine sur son récepteur amorce une cascade de signalisation qui débute par la dimérisation du récepteur. Ceci conduit au rapprochement de deux kinases JAK qui pourront alors se transphosphoryler et ainsi phosphoryler le domaine intracellulaire du récepteur. C'est la somme de ces événements qui conduit à la formation d'un complexe de signalisation fonctionnel qui sert de site d'ancrage pour des protéines à domaine SH2 (« Src Homology 2 »), responsables de la propagation du signal. Les principales cascades de signalisation activées par JAK2 sont la voie JAK/STAT canonique mettant en jeu les facteurs de transcription de la famille STAT (« Signal Transducer and Activator of Transcription »), les MAPK (« Mitogen Activated Protein Kinases ») et la voie PI3K (« Phosphatidylinositol-3'-Kinase ») (Figure 5).

#### *b. Les facteurs de transcription STAT :*

Chez les mammifères, les facteurs de la famille STAT sont au nombre de sept (STAT1-4, 5a, 5b et 6). Une fois activée, JAK2 phosphoryle sur des résidus tyrosine la partie cytosolique du récepteur auquel elle est liée et permet le recrutement directement sur ces motifs phosphorylés des facteurs STAT1, STAT3, STAT5a et STAT5b préférentiellement. Puis JAK2 phosphoryle les facteurs STAT sur des résidus tyrosine spécifiques. Une fois phosphorylés, ils forment des dimères puis sont rapidement transloqués vers le noyau où ils exercent leurs

fonctions d'activateurs de la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire comme Bcl-2 ou Bcl-xL (« B-cell lymphoma »), la prolifération (comme la cycline D1, c-myc ou PIM-1) ou l'invasion (comme certaines métalloprotéases) (Figure 5). Par ailleurs, plusieurs évidences ont démontré que ces facteurs de transcription pouvaient réguler positivement ou négativement des processus clés du métabolisme cellulaire comme la respiration mitochondriale ou l'autophagie (Wegrzyn et al., 2009; You et al., 2015).

### *c. Les voies des MAPK :*

Les MAPK sont un groupe de sérine/thréonine kinases exprimées de manière ubiquitaire, elles sont impliquées dans la conversion de stimuli extracellulaires en un large spectre de réponses cellulaires. Les MAPK sont réparties en différentes voies chacune composées de trois kinases agissant de manière séquentielle. Premièrement, une MAP3K (MAPK kinase kinase) phosphoryle et active une MAP2K (MAPK kinase) qui pourra à son tour stimuler une MAPK par phosphorylation. Les trois principales voies de MAPK activées en aval de JAK2 sont les kinases des voies ERK1/2 (« extracellular signal-regulated kinases 1 & 2 »), p38 et JNK (« c-Jun amino-terminal kinases »). Une fois activées, les MAPK ciblent de nombreuses protéines, elles phosphorylent des facteurs de transcription (e.g. c-Myc, c-Jun, c-Fos, ATF2, STAT3 ou CHOP) pour réguler l'expression de gènes mais aussi des protéines favorisant la prolifération, la survie, la croissance et la migration cellulaire (Tóthová et al., 2021) (Figure 5).

### *d. La voie PI3K/AKT :*

La voie des PI3K de classe I est impliquée dans la médiation de signaux de survie, de prolifération et de différenciation. En aval de JAK2, elle est activée par le recrutement sur le récepteur de cytokine de la PI3K, directement ou indirectement *via* l'action de divers adaptateurs. Une fois active, la PI3K catalyse la conversion du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). L'accumulation de PIP3 à la membrane plasmique conduit au recrutement et à l'activation de la PDK1 (« phosphoinositide-dependent kinase 1 ») qui pourra ensuite stimuler la sérine/thréonine kinase AKT (RAC-gamma serine/threonine-protein kinase), acteur central dans la signalisation PI3K/AKT. Les principales cibles en aval d'AKT sont les facteurs de transcription FOXO3 (« forkhead box protein O3 ») et GATA1 (« GATA-binding factor 1 ») qui sont essentiels à l'érythropoïèse, le facteur de réponse à l'hypoxie HIF1 $\alpha$  (« hypoxia-inducible factor 1-alpha ») et le complexe mTORC1 (« mammalian target of rapamycin complex 1 ») (Tóthová et al., 2021). De par son rôle dans la stimulation de mTORC1, la voie PI3K/AKT régule positivement la croissance et la prolifération cellulaire. En effet, mTORC1 promeut différents processus anaboliques comme la traduction de protéines ou la synthèse de lipides. Cette voie de signalisation stimule également la biogenèse mitochondriale et biosynthèse des ribosomes,

essentiels à la survie et à la croissance cellulaire. Le complexe mTORC1 limite également divers processus cataboliques comme l'autophagie en inhibant les protéines ULK1 (« Unc-51-like kinase 1 ») et ATG13 (Laplante and Sabatini, 2009) (Figure 5).

#### *e. Mécanismes d'interruption de la signalisation de JAK2 :*

Les mécanismes d'activation de la signalisation dépendante de JAK2 sont finement régulés. En ce sens, plusieurs protéines permettant de limiter la durée et l'amplitude du signal ont été décrites (Richmond et al., 2005) (Figure 5).

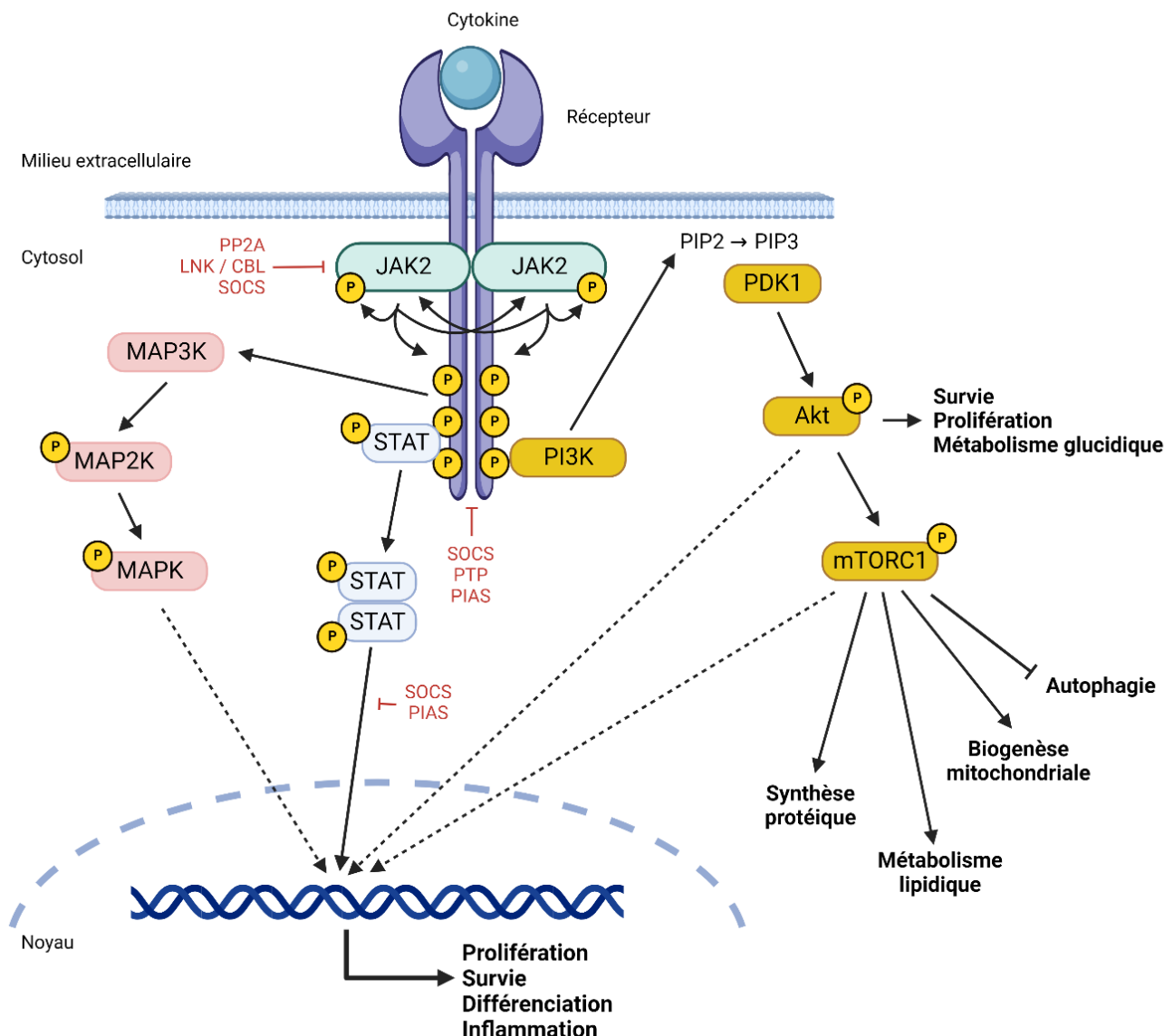
Les protéines SOCS (« Suppressor Of Cytokine Signaling ») interagissent avec des résidus tyrosine phosphorylés sur le récepteur de cytokine et bloquent le recrutement des acteurs moléculaires situés en aval de JAK2. Elles sont directement régulées transcriptionnellement en aval de JAK2 par les facteurs STAT, permettant ainsi la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle négatif. Enfin, les protéines SOCS permettent le recrutement d'enzymes E3 ligases sur le JAK2 phosphorylé, entraînant l'ubiquitination de JAK2 et sa dégradation par le protéasome (Ungureanu et al., 2002).

Les protéines PIAS (« Protein Inhibitors of Activated STAT ») sont une famille de protéines exprimées constitutivement capables de se fixer sur les facteurs STAT et d'inhiber leur activité transcriptionnelle en bloquant l'interaction de STAT avec l'ADN. D'autre part, il a été décrit que les PIAS pouvaient agir comme des E3-like ligases catalysant des réactions de SUMOylation et contrôler ainsi l'activité de protéines impliquées dans les voies de signalisation JAK/STAT ou PI3K/AKT (Rabellino et al., 2017).

Plusieurs protéines à activité tyrosine phosphatase (PTP) participent à la régulation de la signalisation de JAK en déphosphorylant JAK2 et ses substrats pour réduire leur activité (Tonks, 2006). Ces PTP ont initialement été décrites comme constitutivement actives et faiblement régulées, ne constituant pas une boucle de rétrocontrôle. De ce fait, l'amplitude de la signalisation de JAK serait la résultante d'un équilibre entre une activité kinase finement régulée et une activité phosphatase présente à l'état basal. Cependant, il apparaît aujourd'hui que les PTP sont régulées au niveau de leur expression, de leur localisation ou de leur activité par divers mécanismes encore peu documentés.

D'autres régulateurs négatifs sont décrits comme les protéines adaptatrices LNK (Takaki et al., 2002) et CBL (Lv et al., 2017) qui interagissent directement avec JAK2 pour l'inhiber et conduire à l'ubiquitination de JAK2 et à sa dégradation par le protéasome.

Enfin, la protéine phosphatase 2A (PP2A), une sérine/thréonine phosphatase, est retrouvée associée à JAK2 (Yokoyama et al., 2001). Ce complexe formé par l'association d'une kinase et d'une phosphatase où chacun peut potentiellement être le substrat de l'autre permet une fine régulation des cascades de signalisation en aval (le rôle de PP2A sera développé dans la partie V paragraphe B).



**Figure 5 : Les principales voies de signalisation dépendantes de JAK2.**

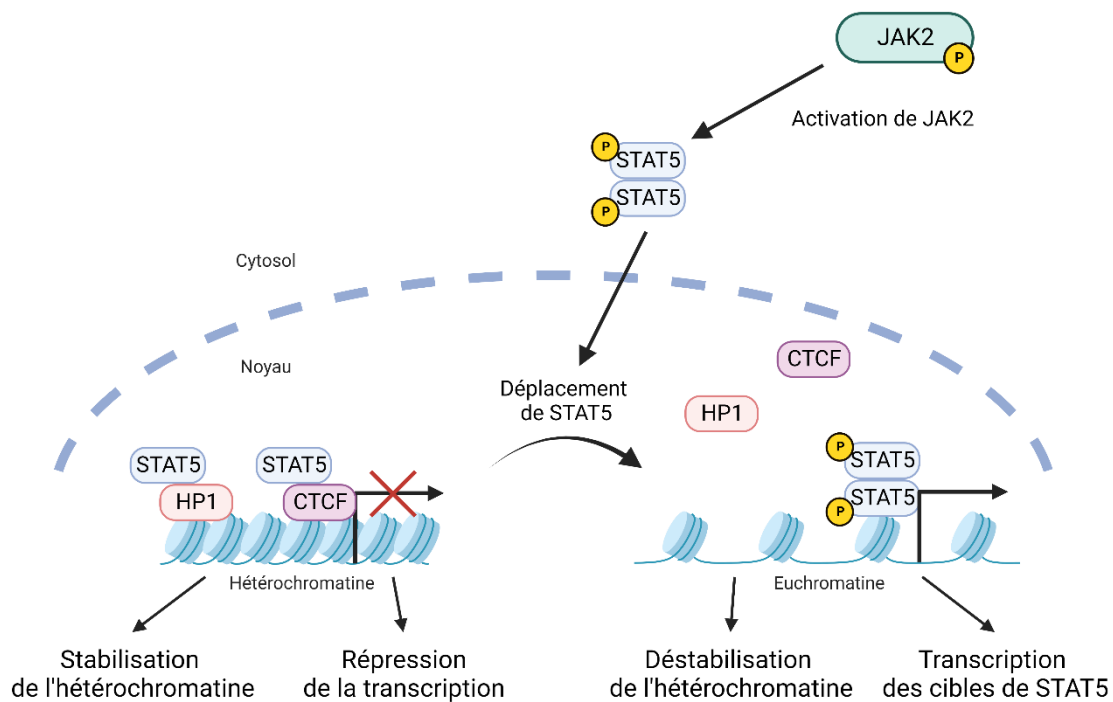
La fixation d'une cytokine sur son récepteur conduit à l'activation de JAK2 qui pourra alors s'autophosphoryler et phosphoryler le récepteur auquel il est associé. Ceci conduit essentiellement au recrutement et à l'activation des voies de signalisation STAT, PI3K/AKT/mTORC1 et des MAPK. Ces différentes voies régulent au niveau transcriptionnel ou protéique un ensemble de processus tels que la prolifération, la survie, la différenciation ou le métabolisme. Plusieurs protéines comme les SOCS, les PTP ou PP2A régulent négativement l'amplitude et la durée de la signalisation de JAK2. (Abréviations : PP2A : protéine phosphatase 2A, LNK : lymphocyte adapter protein, CBL : Casitas B-lineage lymphoma, SOCS : suppressor of cytokine signaling, PTP : tyrosine-protein phosphatase, PIAS : protein inhibitor of activated STAT protein).

#### *f. La voie JAK/STAT non canonique :*

Parallèlement à la voie JAK/STAT dite canonique, les facteurs STAT non phosphorylés, initialement décrits comme inactifs et localisés dans le cytosol, peuvent également être retrouvés dans le noyau et exercer certaines fonctions. C'est par exemple le cas du STAT5 non phosphorylé qui s'associe dans le noyau à la protéine HP1 (« heterochromatin protein 1 »)



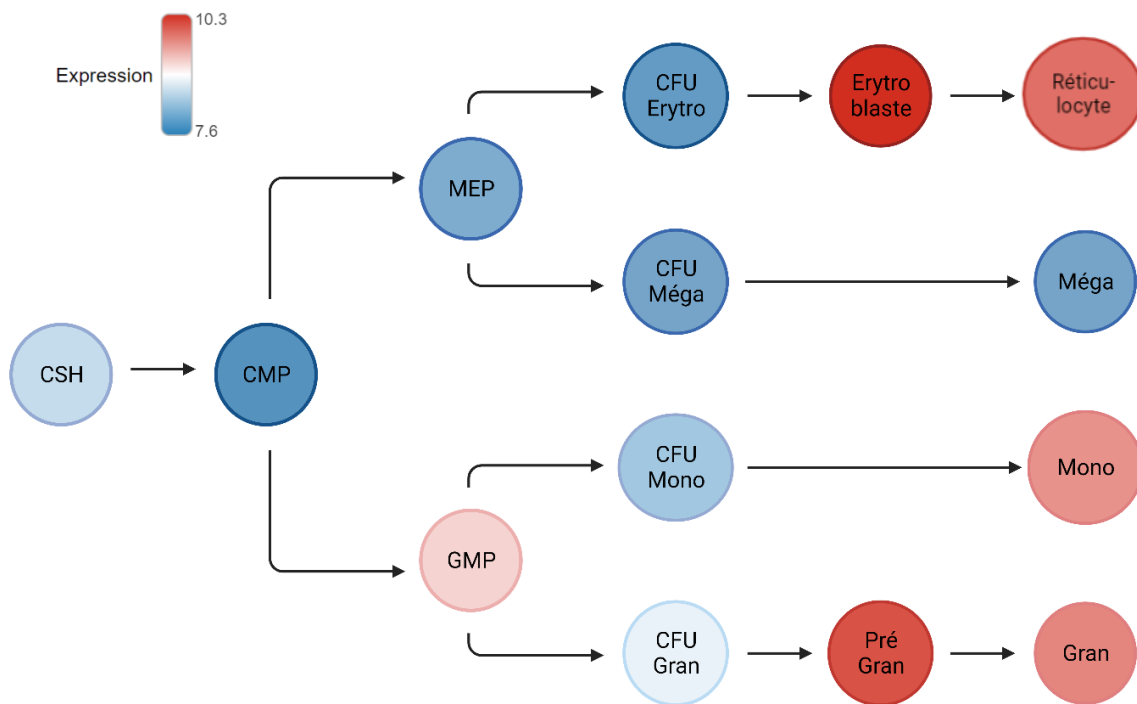
et permet la stabilisation de l'hétérochromatine et la répression de gènes (Hu et al., 2013) (Figure 6). Par conséquent, l'activation canonique de la voie JAK/STAT conduit à la phosphorylation de STAT5 et à son déplacement vers l'euchromatine. Dans ce contexte, on observe alors une déstabilisation de l'hétérochromatine. Le réservoir de STAT5 non phosphorylé apparaît donc essentiel au maintien de la stabilité du génome et à la prévention de l'apparition de tumeurs. Une autre étude menée dans des cultures primaires de progéniteurs hématopoïétiques murins a également mis en évidence une localisation nucléaire du STAT5 non phosphorylé. Lorsque la voie JAK/STAT n'est pas active, le STAT5 non phosphorylé est colocalisé avec le répresseur de la transcription CTCF (« CCCTC-binding factor ») dans le noyau et bloque la transcription de gènes impliqués dans la différenciation mégacaryocytaire ainsi que les cibles canoniques du facteur de transcription STAT5 phosphorylé (Park et al., 2016) (Figure 6). La régulation différentielle de divers programmes transcriptionnels par les STAT5 phosphorylés ou non phosphorylés semble donc essentielle au processus de différenciation médiée par les cytokines dans l'hématopoïèse.



**Figure 6 : Mécanisme d'action non canonique de la voie JAK2/STAT5.**

Lorsque la voie JAK2/STAT5 n'est pas active, une fraction de STAT5 non phosphorylé est localisée dans le noyau et contribue à la répression de la transcription de gènes. Lorsque la voie est activée, STAT5 phosphorylé peut alors être recruté dans les régions promotrices de ses gènes cibles et activer leur transcription. En cas d'activation prolongée, ce déplacement de STAT5 de l'hétérochromatine vers l'euchromatine conduit au relargage de la protéine HP1 et à une déstabilisation de l'hétérochromatine.

#### 4. Rôle de JAK2 dans la myélopoïèse :



**Figure 7 : Expression relative de JAK2 au cours de la myélopoïèse humaine.**

Chez l'homme, l'expression de JAK2 est globalement augmentée au cours de la myélopoïèse et plus particulièrement dans l'érythropoïèse. (D'après Bloodspot, dataset « Normal Human Hematopoiesis – DMAP »). Abréviations : Erythro : Erythrocyte, Méga : mégacaryocyte, Mono : Monocyte, Gran : Granulocyte.

JAK2 est exprimé dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques où il est impliqué dans la transduction de signaux de cytokines qui contrôlent l'hématopoïèse. Les niveaux d'activation de la signalisation de JAK2 permettent de contrôler la balance entre auto-renouvellement et différenciation.

En effet, une activation qualifiée d'intermédiaire promeut la quiescence et les capacités d'auto-renouvellement dans les CSH (Akada et al., 2014). Ces effets seraient au moins en partie dus en aval de l'activation de STAT5 à une augmentation de l'expression du facteur de réponse à l'hypoxie HIF2 $\alpha$  et à une répression du facteur de transcription impliqué dans la différenciation myéloïde C/EBP $\alpha$  (« CCAAT/enhancer-binding protein  $\alpha$  ») (Fatrai et al., 2011; Wierenga et al., 2008, 2006).

Par ailleurs, la kinase JAK2 est essentielle à la signalisation contrôlant la production des érythrocytes. En effet, chez la souris, la délétion du gène *Jak2* conduit à des défauts d'érythropoïèse et à une anémie létale à l'état embryonnaire (Neubauer et al., 1998). Au cours de la différenciation myéloïde, les niveaux d'expression de JAK2 sont globalement augmentés et ce notamment au cours de l'érythropoïèse où l'expression de JAK2 est maximale dans les précurseurs érythrocytaires (érythroblastes et réticulocytes) (Figure 7). Les facteurs de transcription STAT5a/b sont essentiels à la signalisation en aval de JAK2, ainsi leur déplétion cause des défauts d'érythropoïèse (Zhu et al., 2008). De manière intéressante, la

surexpression d'un variant constitutivement actif de STAT5a restaure une érythropoïèse normale lorsque celle-ci est bloquée par la déplétion du récepteur à l'EPO ou de JAK2 (Grebien et al., 2008), conférant à STAT5a un rôle clé dans la différenciation érythrocytaire en aval de JAK2. Dans les cellules hématopoïétiques, des niveaux élevés d'expression et d'activation de JAK2 induisent un blocage de la myélopoïèse et favorisent l'érythropoïèse (Wierenga et al., 2008). En effet, l'activation élevée de JAK2 conduit à une plus forte activité du facteur de transcription STAT5 qui reconnaît alors des domaines de liaison de plus faible affinité et active ainsi l'expression de nouveaux gènes (Moucadel and Constantinescu, 2005). Ce mode de régulation dépendant du niveau d'activation de la voie JAK2/STAT5 contrôlerait la différenciation myéloïde des cellules. D'autre part, JAK2 régule l'érythropoïèse en contrôlant l'activation de la voie PI3K et des facteurs de transcription FOXO3A et GATA1 en aval. La déplétion de la PI3K *in vivo* impacte l'érythropoïèse et réduit significativement le nombre de BFU-E chez la souris (Huddleston et al., 2003). Cette voie est donc essentielle à la différenciation terminale des érythrocytes.

## B. Caractérisation de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> :

La mutation somatique JAK2<sup>V617F</sup> correspond à la substitution d'une guanine par une thymidine en position 1849 dans l'exon 14 de *Jak2*. Elle conduit au remplacement de la valine 617 par une phénylalanine dans le domaine pseudokinase JH2 de la protéine JAK2. Cette phénylalanine 617 interagit alors avec les deux résidus phénylalanine 594 et 595 également situés dans le domaine JH2 et avec la phénylalanine 537 située dans la région liant les domaines JH2 et JH3. Le changement de conformation qui en découle conduit à une levée de l'inhibition du domaine kinase JH1 par le domaine pseudokinase, JAK2 se retrouve alors activé constitutivement.

### 1. JAK2<sup>V617F</sup> dans l'étiologie des NMP :

#### a. L'apport des modèles murins :

Plusieurs modèles murins ont été développés pour étudier l'impact de la mutation de JAK2 dans la transformation maligne des cellules hématopoïétiques. En reproduisant les PV et TE humaines ainsi que leur évolution naturelle en myélofibrose, ces modèles ont largement contribué à caractériser le rôle de JAK2<sup>V617F</sup> dans l'occurrence de la maladie mais aussi sa progression (Benlabiod et al., 2022).

Les premiers modèles ont été générés par transduction rétrovirale afin de surexprimer le gène *Jak2* murin muté dans des CSH qui étaient ensuite transplantées dans des souris BALB/c ou C57BL/6 (Bumm et al., 2006; James et al., 2005; Lacout et al., 2006; Wernig et al., 2006;

Zaleskas et al., 2006). Les souris développent alors spontanément une maladie mimant la PV humaine, démontrant que l'expression seule de JAK2<sup>V617F</sup> était suffisante pour induire un phénotype de NMP. Ces premières études ont clairement établi le rôle « *driver* » de la mutation V617F de JAK2 dans l'occurrence de la maladie.

Par la suite, des modèles utilisant une approche de « *knock-in* » ont été développés. Ils permettent d'introduire la mutation par recombinaison homologue dans le locus de *Jak2*. JAK2<sup>V617F</sup> se retrouve alors sous le contrôle de son promoteur endogène et exprimé à des niveaux physiologiques (Akada et al., 2010; Li et al., 2010; Marty et al., 2010; Mullally et al., 2010). Ces études ont également révélé l'existence d'une corrélation entre les niveaux d'expression du transgène et le phénotype observé. En effet, une faible expression de JAK2<sup>V617F</sup> induit un phénotype de TE alors qu'une expression élevée conduit à un phénotype de PV.

Afin de tenir compte de la notion selon laquelle une NMP est un clone malin qui évolue au sein d'une hématopoïèse normale, des modèles murins de transplantation de cellules exprimant JAK2<sup>V617F</sup> en compétition avec des cellules JAK2<sup>WT</sup> ont été développés. Ainsi, il était possible d'étudier plus finement la progression clonale et l'évolution de la maladie en myélofibrose ou en leucémie, notamment en considérant l'effet de mutations secondaires sur ces paramètres. De manière intéressante, il a été montré que la transplantation d'une seule CSH porteuse de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> pouvait induire à long terme un phénotype de NMP. Ceci renforce la notion selon laquelle les NMP sont des affections pouvant émerger d'un seul clone malin (Lundberg et al., 2014).

Enfin, les modèles murins de NMP ont largement contribué aux études précliniques pour l'évaluation de nouvelles stratégies thérapeutiques.

#### *b. Les apports récents des techniques de bio-informatique :*

L'ensemble des études menées dans les modèles murins ont abouti au concept selon lequel les NMP sont des maladies clonales des CSH. Cependant, les modèles *in vivo* ne permettent pas de reproduire totalement les conditions de la maladie humaine notamment dans les premières étapes du développement du clone initial. Des travaux récents (Van Egeren et al., 2021; Williams et al., 2022), ont permis de modéliser l'histoire de l'évolution clonale de la maladie à partir de données de génomique et de transcriptomique à l'échelle de la cellule unique. Dans ces études, les chercheurs se sont basés sur l'apparition de mutations somatiques uniques au cours du temps dans les CSH pour reconstruire *a posteriori* l'architecture clonale et les arbres phylogéniques de l'hématopoïèse de patients atteints de NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

De manière surprenante, ces deux études retrouvent que la première CSH porteuse de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> serait apparue plusieurs décennies avant le diagnostic de la maladie, parfois même durant l'enfance des patients. Le temps de latence entre l'acquisition de la

mutation et la manifestation du phénotype de NMP serait donc bien plus grand que ce qui était généralement admis. Ces observations constituent un changement de dogme et ouvrent la voie à de nombreuses questions sur notamment les facteurs qui permettent le maintien et l'évolution du clone muté durant cette longue période.

En ce sens, la mutation JAK2<sup>V617F</sup> est l'une des plus fréquemment retrouvées chez des individus sains présentant une CHIP où elle apporte un avantage évolutif relatif ou « *relative fitness* » d'environ 15% par rapport aux cellules qui ne portent pas la mutation (Watson et al., 2020). Chez les patients atteints de NMP, la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> apporte un avantage évolutif plus élevé variant de 43% à 68%. Des facteurs qui restent encore à déterminer permettraient donc d'augmenter le « *fitness* » et seraient nécessaires à l'évolution du clone muté et à l'émergence de la maladie par exemple à partir d'une CHIP.

## 2. Conséquences de la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> :

L'activation constitutive de JAK2<sup>V617F</sup> confère aux cellules myéloïdes une hypersensibilité voire une indépendance vis-à-vis des cytokines, conduisant à une myélopoïèse exacerbée dans ses étapes les plus tardives sans impacter significativement le compartiment des CSH. Ceci est en partie dû au rôle prépondérant de JAK2 dans l'hématopoïèse tardive. De plus, il a été démontré que, à l'instar de JAK2 sauvage, les niveaux d'expression de JAK2<sup>V617F</sup> étaient augmentés au cours de la myélopoïèse. A l'échelle de la cellule, la présence de la mutation de JAK2 induit un large spectre de modifications tant dans les signaux de prolifération et de survie que sur le métabolisme cellulaire.

### a. Rôle de JAK2<sup>V617F</sup> dans la prolifération et la survie cellulaire :

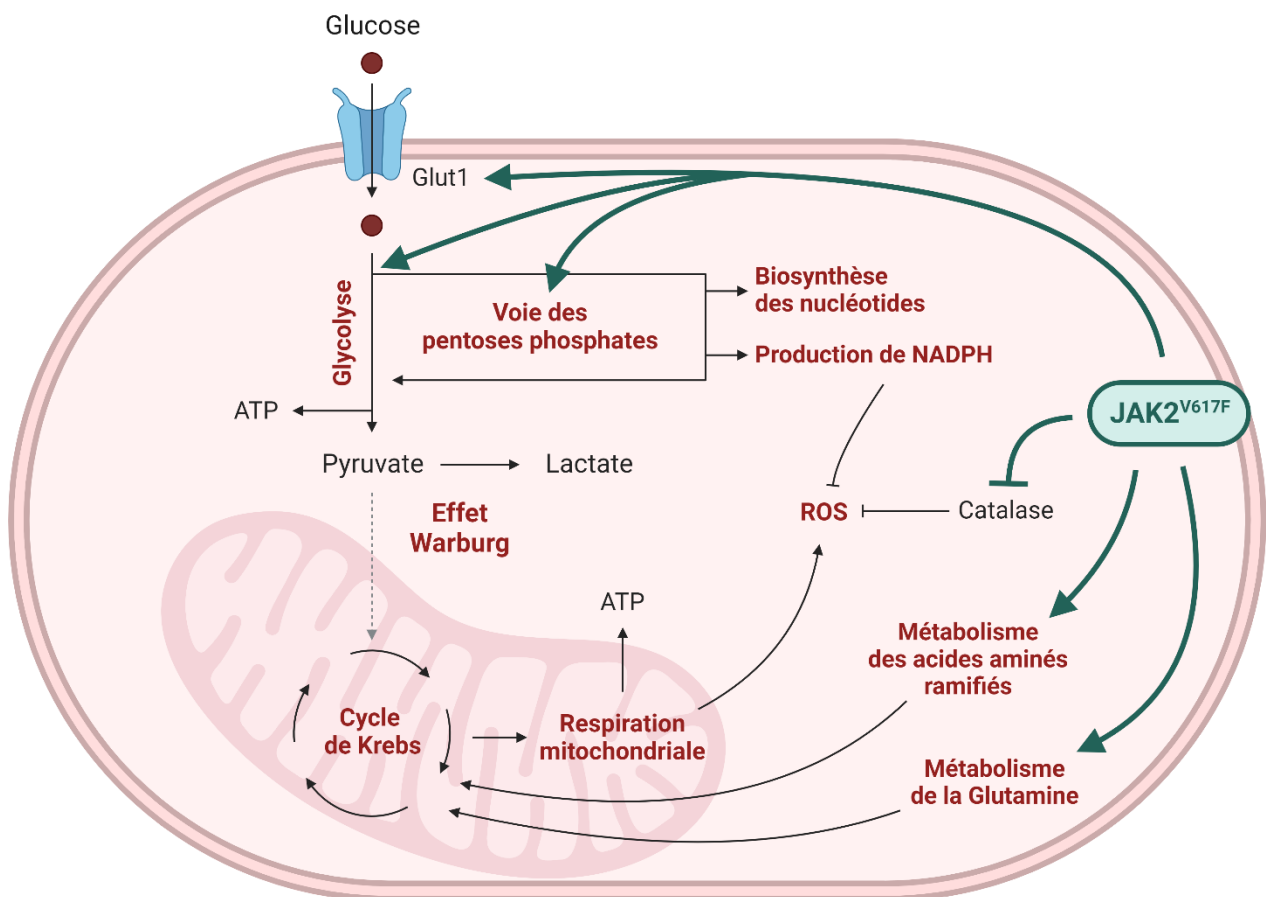
La mutation JAK2<sup>V617F</sup> active de manière constitutive les voies de signalisation dépendantes de JAK2. Ainsi, les signaux classiquement retrouvés en aval des récepteurs à l'EPO, à la TPO et au G-CSF se retrouvent activés indépendamment des cytokines.

Le facteur de transcription STAT5 est la plus étudiée des cibles de JAK2. Lorsque JAK2 est muté, STAT5 est phosphorylé de manière constitutive et exerce son action en stimulant l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie des cellules. Il a également été démontré que les effets oncogéniques de JAK2<sup>V617F</sup> étaient dépendants *in vivo* de l'activation de STAT5 (Funakoshi-Tago et al., 2010).

D'autres travaux ont montré que les voies MAPK et PI3K/AKT sont également activées par JAK2 muté. Ces deux voies de signalisation sont également impliquées dans les signaux de prolifération et de survie. En effet, la voie MAPK induirait des signaux de prolifération cellulaire, alors que la voie PI3K/AKT participerait à la résistance des cellules mutées aux signaux de mort induits par une déprivation en cytokines (Laubach et al., 2009).

Plusieurs publications établissent un lien entre la présence de la mutation V617F de JAK2 et des dérégulations du cycle cellulaire. En effet, JAK2<sup>V617F</sup> stimule l'expression de régulateurs positifs du cycle cellulaire comme par exemple la phosphatase CDC25A (« cell division cycle 25 homolog A »), un régulateur clé de la transition G1/S (Gautier et al., 2012). Cette régulation de CDC25A en aval de JAK2<sup>V617F</sup> est dépendante de STAT5. De plus, il a été démontré que p27<sup>kip1</sup>, un régulateur négatif du cycle cellulaire, et la cycline D2, un activateur de cette transition, étaient respectivement réprimé et activé en aval de JAK2<sup>V617F</sup> (Walz et al., 2006). L'ensemble de ces études démontre que la kinase mutée JAK2<sup>V617F</sup> régule activement le cycle cellulaire, contribuant ainsi à la prolifération exacerbée des cellules mutées dans les NMP.

*b. Conséquences de la mutation sur le métabolisme cellulaire :*



**Figure 8 : Reprogrammations métaboliques induites par la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.**

La présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> induit une augmentation de la glycolyse, de la voie des pentoses phosphates ainsi que du métabolisme de la glutamine et des acides aminés ramifiés qui soutiennent la respiration mitochondriale. L'augmentation du métabolisme mitochondrial couplée à une répression de la catalase par le JAK2 muté conduit à une élévation de la production de ROS. Cette élévation est contrecarrée par la production de NADPH via la voie des pentoses phosphates.

Afin de soutenir leur prolifération accrue, les cellules porteuses de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> présentent des besoins énergétiques élevés en comparaison aux cellules sauvages.

Une étude démontre que la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> stimule la glycolyse en augmentant par des mécanismes encore indéterminés l'expression du transporteur membranaire du glucose Glut1 et de l'enzyme PFKB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphate). Ainsi, cette glycolyse exacerbée supporte le métabolisme énergétique et la prolifération élevée des cellules mutées *in vitro* et *in vivo* (Reddy et al., 2012). En revanche, le pyruvate issu de la glycolyse est dévié vers la fermentation et la production d'acide lactique. Ce processus caractéristique de la plupart des cellules tumorales est appelé effet Warburg.

Par ailleurs, la respiration mitochondriale est également augmentée dans les cellules qui présentent la mutation JAK2<sup>V617F</sup> (Zhan et al., 2015). Cette activité mitochondriale accrue est soutenue par un métabolisme de la glutamine élevé. En effet, l'expression de la glutaminase, une enzyme clé qui permet la génération de glutamate à partir de glutamine, est augmentée dans des cellules de patient JAK2<sup>V617F</sup> en comparaison aux cellules arborant un JAK2 sauvage. La respiration mitochondriale peut également être soutenue par le métabolisme d'acides aminés ramifiés tels que la valine, la leucine et l'isoleucine. Il a été montré que des dérégulations épigénétiques dans les NMP pouvaient induire l'expression de la protéine BCAT1 (« branched chain amino acid transaminase 1 ») normalement réprimée dans les cellules hématopoïétiques. Cette enzyme est responsable d'un métabolisme des acides aminés ramifiés élevé qui soutient la progression de la maladie et notamment la transformation des NMP en leucémie (Gu et al., 2019; Hattori et al., 2017).

L'ensemble de ces résultats a été confirmé par une étude dans des modèles murins de NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Les cellules mutées présentent *in vivo* une augmentation de la capture du glucose, de la glycolyse et de la respiration mitochondriale (Rao et al., 2019). Ces changements métaboliques forts au niveau des cellules tumorales induisent des adaptations systémiques du métabolisme de l'hôte. En effet, la progression du clone tumoral induit un état de « crise énergétique » caractérisé par une hypoglycémie et une atrophie du tissu adipeux.

L'une des conséquences métaboliques de ces dérégulations est l'augmentation possible des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les cellules mutées JAK2<sup>V617F</sup>. C'est ce qui a en effet été observé dans une étude montrant que la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> dans des cellules de NMP induisait une élévation des taux de ROS qui participe à la progression tumorale *in vivo* dans un modèle murin de NMP JAK2<sup>V617F</sup> (Marty et al., 2013). Ici, l'élévation des ROS est en partie médiée directement par JAK2<sup>V617F</sup> qui réprime l'expression de la catalase, une enzyme antioxydante, via l'activation de la voie PI3K/AKT. Les conséquences fonctionnelles d'une élévation des niveaux de ROS peuvent être multiples et sont dose-dépendantes. Une augmentation modérée participe à la prolifération et à la survie des cellules. En revanche, un taux de ROS supérieur aux capacités antioxydantes serait délétère pour la cellule. Une augmentation de la voie des pentoses phosphates est également décrite dans les cellules exprimant la mutation JAK2<sup>V617F</sup> (Rao et al., 2019). Cette voie permet notamment la production de NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), un coenzyme réduit nécessaire à l'activité de détoxification des ROS par le glutathion. La voie

des pentoses phosphates pourrait donc potentiellement participer à un maintien des capacités de tolérance aux ROS des cellules mutées. La voie des pentoses phosphates permet également d'alimenter la biosynthèse de nucléotides nécessaire à la prolifération accrue des cellules et contribue également au métabolisme énergétique en générant des intermédiaires de la glycolyse.

D'après l'ensemble de ces études, la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> dans les cellules de NMP induit de profonds changements métaboliques qui convergent vers une production énergétique élevée tout en maintenant un équilibre du stress oxydant (Figure 8). Cette adaptation métabolique induite par l'oncogène soutient la prolifération cellulaire et donc la progression tumorale. Il apparaît ainsi que la perturbation de diverses voies métaboliques, tant dans l'équilibre entre anabolisme et catabolisme que dans l'équilibre du stress oxydant, pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante.

### *c. Accroissement de l'instabilité génétique par JAK2<sup>V617F</sup> :*

Plusieurs études indiquent un rôle de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> dans l'apparition d'un phénotype « mutagène » dans les NMP. Cette instabilité génétique prône à l'apparition de nouvelles mutations participe à la croissance tumorale et à la progression des NMP (Plo et al., 2008). Plusieurs mécanismes expliquant comment le mutant JAK2<sup>V617F</sup> induit cet état pro-mutagène ont été décrits. En effet, la présence de la mutation de JAK2 induit une accélération de la progression dans le cycle cellulaire. Ceci favorise l'occurrence d'erreurs de la machinerie de réplication de l'ADN. Par ailleurs, l'activation constitutive de JAK2<sup>V617F</sup> dérégule les mécanismes de recombinaison homologue sans impacter la voie de réparation du NHEJ (« nonhomologous end joining »), favorisant ainsi l'apparition de mutations ponctuelles, de délétions ou d'insertions (Plo et al., 2008). De plus, les cellules qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup> présentent un défaut d'activation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN ATR/CHK1 (Chen et al., 2014) et une résistance à l'apoptose induite par les dommages à l'ADN (Ahn et al., 2016). Enfin, il a été rapporté que la mutation de JAK2 augmentait l'expression de MDM2 (« murine double minute 2 »), une protéine induisant la dégradation de p53 et donc un blocage de la réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (Nakatake et al., 2012). Il apparaît donc d'après l'ensemble de ces données de la littérature que la présence de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> induit dans les cellules une augmentation de la survenue de dommages à l'ADN et une résistance à la mort cellulaire induite par ces derniers. Ceci crée alors un contexte favorable à la survenue d'erreurs et donc à une augmentation de l'instabilité génétique.

Cependant, les études de bio-informatique qui ont tenté de reconstruire l'histoire phylogénétique des NMP n'ont pas révélé d'augmentation de la survenue de mutations dans les cellules qui expriment la mutation JAK2<sup>V617F</sup> par rapport aux cellules sauvages (Van Egeren et al., 2021; Williams et al., 2022). Ce résultat contrintuitif au vu des données de la littérature



pourrait signifier que la présence de la mutation  $JAK2^{V617F}$  seule ne suffit pas à augmenter l'instabilité génétique. Le clone malin serait donc à l'origine stable et suivrait une lente évolution avant que le phénotype de NMP ne soit déclaré. L'augmentation de l'instabilité génétique au sein du clone malin surviendrait alors ultérieurement et contribuerait à l'évolution de la maladie comme par exemple à la transformation en leucémie.

#### *d. Impact de la mutation $JAK2^{V617F}$ dans la régulation épigénétique :*

En raison du rôle de la voie JAK/STAT non canonique dans la régulation épigénétique, il apparaît logique que l'expression de  $JAK2^{V617F}$  impacte l'épigénome des cellules. En effet, l'activation constitutive de JAK2 induit un déplacement de STAT5 vers l'euchromatine et la déstabilisation de l'hétérochromatine (Hu et al., 2013).

Par ailleurs, il a été montré que la présence de la mutation  $JAK2^{V617F}$  conduit à un changement de localisation de JAK2. Il a été ainsi montré que dans des lignées cellulaires de NMP qui portent cette mutation,  $JAK2^{V617F}$  pouvait être partiellement localisé dans le noyau où il phosphorylerait l'histone H3 et donc ici encore déstabiliser l'hétérochromatine (Dawson et al., 2009). Cependant la localisation nucléaire de JAK2 est encore aujourd'hui un concept controversé (Girodon et al., 2011). De plus,  $JAK2^{V617F}$  réprime la méthyltransférase PRMT5, une enzyme impliquée dans la modification des histones et la répression épigénétique, ce qui conduit à une augmentation de l'expression de gènes favorisant la prolifération et la différenciation myéloïde des cellules de NMP (Liu et al., 2011).

L'ensemble de ces modifications induites par l'expression de  $JAK2^{V617F}$  favorise l'activation d'oncogènes et pourrait participer à l'augmentation de l'instabilité génétique observée dans les NMP. Dans ces pathologies, les dérégulations épigénétiques du contrôle de l'expression des gènes représentent donc un élément clé dans la signalisation oncogénique de  $JAK2^{V617F}$ .

#### *e. Conséquences de $JAK2^{V617F}$ sur l'échappement immunitaire :*

La capacité à échapper à la surveillance du système immunitaire constitue une des caractéristiques des cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2011). Une étude récente a montré que l'activation constitutive de  $JAK2^{V617F}$  augmente l'expression de PD-L1, une protéine de point de contrôle immunitaire qui inhibe la réponse cytotoxique des lymphocytes T (Prestipino et al., 2018). Cette régulation est transcriptionnelle et est dépendante de STAT3 et STAT5. Ainsi, un traitement par immunothérapie avec des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire réduit significativement la progression tumorale dans un modèle murin de NMP  $JAK2^{V617F}$ .

Ces résultats permettent d'émettre de nouvelles hypothèses quant aux mécanismes favorisant l'émergence d'un phénotype de NMP à partir d'un seul clone porteur de la mutation  $JAK2^{V617F}$ . En effet, la capacité des cellules mutées à échapper au contrôle du système

immunitaire pourrait être l'un des facteurs décisifs contribuant à la survie et à l'expansion du clone muté et à l'émergence de la maladie.

#### *f. Rôle de JAK2<sup>V617F</sup> dans l'inflammation :*

De par le rôle de JAK2 dans la transmission de signaux de cytokines, la mutation V617F de JAK2 a clairement été associée à un état d'inflammation chronique qui favorise l'expansion du clone malin et aggrave les symptômes de la maladie chez les patients (Hermouet et al., 2015). En effet, on retrouve chez les patients des niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme l'interleukine-6 ou le TNF $\alpha$  qui induisent la prolifération des cellules et la progression de la maladie.

L'étude de l'ensemble des dérégulations induite par l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> permet une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la production exacerbée des cellules tumorales et permet l'identification de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des NMP JAK2<sup>V617F</sup>.

## **C. Les traitements des NMP BCR-ABL1 négatives :**

### **1. Les traitements actuels :**

Si les traitements de la LMC par des inhibiteurs de la tyrosine kinase muté BCR-ABL1 comme l'imatinib sont très efficaces, ceux des autres NMP sont principalement symptomatiques. Ils visent essentiellement à réduire les risques à court terme de thrombose et d'hémorragie notamment en réduisant le volume sanguin par la pratique régulière de saignées dans le cadre de la PV ou en fluidifiant le sang par l'administration d'aspirine à faible dose. Un agent myélosuppresseur comme l'hydroxyurée (HU) peut également être prescrit. Cet antimétabolite bloque la prolifération cellulaire en inhibant la ribonucléotide réductase, une enzyme catalysant la synthèse des désoxyribonucléotides qui composent l'ADN et réduit ainsi la production de cellules myéloïdes. Un traitement par différentes formes d'interféron alpha (IFN $\alpha$ ) permet également de contrôler les signes de la maladie en ciblant directement les CSH qui expriment JAK2<sup>V617F</sup> (Austin et al., 2020; Rao et al., 2021). Ce médicament active le récepteur à l'IFN $\alpha$  et la signalisation de STAT1 en aval, augmente la production de ROS et donc l'apparition de dommages à l'ADN dans les CSH. Ceci conduit à une sortie de quiescence et à l'exhaustion des CSH, réduisant ainsi la production exacerbée de cellules myéloïdes.

Enfin, le seul traitement curatif disponible dans les NMP est la transplantation allogénique de CSH pour restaurer une moelle osseuse normale. En raison du faible nombre de donneurs

histocompatibles et de fréquentes comorbidités, elle est rarement utilisée et essentiellement réservée aux patients atteints de MFP à un stade avancé.

La découverte en 2005 de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> comme étant responsable de l'occurrence de la maladie a ouvert la voie au développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant JAK2 pour le traitement des NMP. Ces médicaments agissent en abrogeant la signalisation de JAK2, constitutivement activé dans une vaste majorité de NMP.

## 2. Les thérapies ciblant JAK2 dans les NMP BCR-ABL1 négatives :

Les inhibiteurs de JAK sont classés en différents types en fonction de leur mécanisme d'action (Vainchenker et al., 2018). Les inhibiteurs de type I et II sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, ils bloquent l'activité kinase en se fixant au niveau de la poche de liaison de l'ATP et stabilisent JAK2 sous sa conformation active ou inactive respectivement. Enfin, les inhibiteurs allostériques fixent JAK2 sur un domaine autre que le site de liaison à l'ATP. Cette dernière classe d'inhibiteurs agirait en se fixant sur des sites impliqués dans le contrôle de l'activation de JAK2 comme par exemple le domaine pseudokinase (Leroy and Constantinescu, 2017). En raison du fort degré d'homologie des domaines de liaison à l'ATP des différentes kinases, les inhibiteurs de type I et II engendrent généralement des effets indésirables dus à l'inhibition non spécifique d'autres kinases. Les inhibiteurs allostériques représentent donc un intérêt pour la clinique car ils permettraient théoriquement de réduire ces effets indésirables. Dans le cadre des NMP, ils permettraient également d'inhiber préférentiellement le JAK2 muté par rapport au JAK2 sauvage et donc de s'affranchir d'une éventuelle toxicité due à l'inhibition de l'hématopoïèse normale. Cependant, peu d'inhibiteurs allostériques ont été développés et l'ensemble des inhibiteurs de JAK2 actuellement testés en clinique sont de type I (Tableau 3).

Inhibiteur	Maladie	Phase développement	Référence
<b>Type I</b>			
Ruxolitinib	MFP PV réfractaire à l'HU	Approuvé Approuvé	Harrison et al., 2012; Vannucchi et al., 2015; Verstovsek et al., 2012
Fedratinib	MFP PV réfractaire à l'HU	Approuvé Approuvé	Mesa et al., 2021; Pardanani et al., 2015; Pardanani et al., 2021
Pacritinib	MFP cytopénique	Approuvé Etats-Unis	Mesa et al., 2017a; Venugopal and Mascarenhas, 2022
Momelotinib	MFP PV et TE	Phase III – stoppé Phase II	Mesa et al., 2017b; Verstovsek et al., 2017a
AZD1480	MFP	Phase I	Verstovsek et al., 2015
Gandotinib	NMP	Phase I + Phase II	Berdeja et al., 2018; Verstovsek et al., 2017b
XL019	PV et MFP	Phase I	Verstovsek et al., 2014
NS-018	MFP	Phase I	Verstovsek et al., 2017c
<b>Type II</b>			
BBT594	NMP	Lignées cellulaires	Andraos et al., 2012
CHZ868	NMP	Modèles murins	Meyer et al., 2015
<b>Inhibiteurs allostériques</b>			
LS104	NMP	Lignées cellulaires	Lipka et al., 2008
ON044580	NMP	Lignées cellulaires	Jatiani et al., 2010

**Tableau 3 : Liste des principaux inhibiteurs de JAK2 développés pour le traitement des NMP.**

(Adapté de Vainchenker et al., 2018).

En 2011, une autorisation de mise sur le marché pour le traitement des NMP du ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/JAK2, a été obtenue. Il est actuellement prescrit dans la MFP et la PV réfractaire à l'HU. En effet, 15 à 20% des patients atteints de PV développent sous HU une résistance caractérisée par une reprise de la prolifération des cellules cancéreuses sous traitement, ou une intolérance définie notamment par l'apparition d'une toxicité hématologique (Barosi et al., 2010).

Ce médicament permet de contrôler les symptômes des patients en bloquant la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques, en réduisant la splénomégalie et en limitant l'inflammation (Harrison et al., 2012; Vannucchi et al., 2015; Verstovsek et al., 2012).

Cependant, ce traitement présente des effets indésirables essentiellement hématologiques. En effet, il ne permet pas un ciblage spécifique du JAK2 muté et inhibe donc également la signalisation de l'EPO et de la TPO qui dépend de JAK2 sauvage. Ceci peut alors entraîner une anémie ou une thrombopénie conduisant à un arrêt du traitement. D'autre part, en raison du rôle prépondérant de JAK2 dans l'hématopoïèse tardive, le ruxolitinib cible préférentiellement les cellules les plus différenciées et présente un défaut de ciblage des populations de CSH les plus primitives qui sont les cellules initiatrices de la maladie (Austin et al., 2020). De plus, le ruxolitinib ne bloque pas l'évolution à long terme de la maladie et notamment la transformation en LAM.

Malgré les espoirs placés dans ce traitement, les bénéfices du ruxolitinib se sont donc avérés relativement limités. Ces limites ont été confirmées par la publication des résultats à long terme des essais cliniques COMFORT-I et II dans lesquels plus de 70% des patients ont interrompu leur traitement dans les 5 premières années principalement en raison d'effets indésirables ou suite à une reprise de la progression de la maladie durant cette période (Harrison et al., 2016; Verstovsek et al., 2017). Dans ces deux études, environ un quart des patients ont subi une interruption du traitement en raison d'effets indésirables et plus de 20% ont arrêté le traitement. Globalement, les options thérapeutiques après l'arrêt du ruxolitinib sont réduites, ce qui assombrit le pronostic pour les patients avec une réduction de la survie médiane à environ 14 mois (Newberry et al., 2017). Le traitement en deuxième ligne avec de nouveaux inhibiteurs de JAK2 a alors été proposé chez ces patients (Harrison et al., 2017). Pour cela de nouveaux inhibiteurs ont été développés. Un autre inhibiteur de type I, le fedratinib, qui présente une meilleure spécificité vis-à-vis de JAK2 est autorisé sur le marché dans la myélofibrose primaire ou secondaire à une PV ainsi que dans la TE. Ce médicament ne présente pas d'amélioration du service médical rendu par rapport au ruxolitinib (Mesa et al., 2021; Pardanani et al., 2021, 2015). Dans le même sens, un troisième inhibiteur de JAK2, le pacritinib, a été approuvé par la FDA (« Food and Drug Administration ») aux Etats-Unis en février 2022 chez les patients atteints de myélofibrose qui présentent une cytopénie (Ruben A Mesa et al., 2017; Venugopal and Mascarenhas, 2022).

Cependant, il apparaît dans l'ensemble de ces études que la réponse aux inhibiteurs de JAK2 est incomplète et souvent limitée dans le temps. Une meilleure compréhension de la biologie des NMP JAK2<sup>V617F</sup> et notamment des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de JAK est donc nécessaire dans le but d'identifier de nouvelles combinaisons avec le ruxolitinib afin d'améliorer son efficacité et donc la prise en charge des patients.

### 3. Les thérapies combinées avec le ruxolitinib en cours de développement clinique :

Récemment, de nombreux essais cliniques visent à évaluer l'efficacité de la combinaison du ruxolitinib avec de nouvelles drogues dans le traitement des NMP. Les molécules proposées ciblent essentiellement des mécanismes moléculaires qui ont été identifiés comme critiques dans la biologie des NMP comme la stabilité de JAK2, des voies de signalisation, l'apoptose, l'inflammation ou l'épigénétique (Loscooco and Vannucchi, 2022) (Tableau 4).

Combinaison Evaluée	Mécanisme d'action	Maladie	Référence essai clinique
<b>Réponse immunitaire / inflammation</b>			
IFN $\alpha$ pégylé	IFN $\alpha$ pégylé	Myélofibrose	NCT02742324
Thalidomide	Immunomodulateur	Myélofibrose	NCT03069326
Lenalidomide		Myélofibrose	NCT01375140
Pomalidomide		Myélofibrose	NCT01644110
<b>Epigénétique</b>			
Azacitidine	Agent hypométhylant	Myélofibrose	NCT01787487
Decitabine		Myélofibrose	NCT04282187
Pelabresib	BET inhibiteur	Myélofibrose	NCT04603495
Panobinostat	HDAC inhibiteur	Myélofibrose	NCT01693601
<b>Stabilité de JAK2</b>			
PU-H71	HSP90 inhibiteur	Myélofibrose	NCT03935555
<b>Apoptose</b>			
Navitoclax	Bcl-2 inhibiteur	Myélofibrose	NCT04472598
Navtemadlin	MDM2 inhibiteur	Myélofibrose	NCT04485260
<b>Voies de signalisation</b>			
PIM447/LEE011	PIM / CDK4/6 inhibiteurs	Myélofibrose	NCT02370706
Parsaclisib	PI3K $\delta$ inhibiteur	Myélofibrose	NCT04551053
Umbralisib		Myélofibrose, PV	NCT02493530
Idelalisib		Myélofibrose	NCT02436135

**Tableau 4 : Liste des principaux essais cliniques basés sur une combinaison avec le ruxolitinib.**

(Adapté de Loscocco and Vannucchi, 2022).

Parmi ces essais basés sur un traitement au ruxolitinib, certains évaluent l'efficacité du ciblage de mécanismes qui ont directement été impliqués en aval de l'inhibition de JAK2<sup>V617F</sup> dans la résistance au traitement. En effet, plusieurs mécanismes de résistance au ruxolitinib ont été identifiés.

## **D. Mécanismes de résistance au ruxolitinib :**

### **1. La résistance au ruxolitinib n'est pas génétique :**

Dans d'autres hémopathies malignes, un traitement par des inhibiteurs de tyrosine kinase peut induire une pression de sélection sur les cellules et favoriser l'apparition de mutations secondaires au niveau de la kinase ciblée qui permettent alors aux cellules de résister aux inhibiteurs employés. Cette résistance génétique est par exemple fréquemment observée dans la LMC. En effet l'imatinib, en ciblant la tyrosine kinase dérégulée BCR-ABL1, favorise l'émergence de mutations secondaires sur cette kinase qui confèrent aux cellules une résistance à l'inhibiteur. C'est également le cas dans les LAM qui expriment le récepteur tyrosine kinase muté FLT3-ITD où l'apparition de la mutation secondaire FLT3-TKD confère aux cellules une résistance aux inhibiteurs de cet oncogène dérégulé.

Ce mécanisme de résistance génétique a été décrit dans des lignées cellulaires exprimant JAK2<sup>V617F</sup> dans lesquelles des mutations secondaires ont été observées dans le domaine de liaison de la drogue à JAK2 suite à une exposition prolongée au ruxolitinib (Deshpande et al., 2012). En revanche, bien qu'il existe des formes familiales de thrombocytose qui expriment un JAK2 muté qui résistent naturellement aux inhibiteurs de JAK (Marty et al., 2014), l'apparition de telles mutations secondairement à un traitement au ruxolitinib n'a jamais été observée chez les patients (Andreoli et al., 2013). Ceci suggère notamment que la pression de sélection exercée par le ruxolitinib n'est pas suffisamment élevée pour favoriser l'apparition de telles mutations. D'autres mécanismes de résistances sont donc mis en jeu pour permettre aux cellules de survivre au traitement.

### **2. Résistance au ruxolitinib par réactivation de la signalisation de JAK2 :**

#### *a. Réactivation croisée des kinases JAK :*

Une des limitations du ruxolitinib (et des autres inhibiteurs de type I) est qu'il stabilise le JAK2 inhibé sous sa conformation active hyperphosphorylée. Ceci induit une adaptation fonctionnelle réversible des cellules qui réactivent la signalisation de JAK2 après une

exposition prolongée au traitement par la formation d'hétérodimères entre JAK2 et d'autres kinases JAK (Koppikar et al., 2012). Les inhibiteurs de type I ne seraient donc pas suffisamment efficaces pour inhiber JAK2. Ceci renforce le besoin de développer de nouveaux inhibiteurs de JAK2 de type II qui stabilisent la kinase sous sa forme inactive. Les inhibiteurs allostériques seraient également d'un grand intérêt puisqu'ils présentent également l'avantage de pouvoir potentiellement cibler plus spécifiquement JAK2<sup>V617F</sup> par rapport au JAK2 sauvage (Figure 9).

#### *b. Réactivation de la signalisation en aval de JAK2 :*

L'une des conséquences de la formation d'hétérodimères de JAK sous traitement au ruxolitinib est la réactivation des voies de signalisation en aval de JAK2. Ainsi la combinaison du ruxolitinib avec des inhibiteurs des voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR (Bartalucci et al., 2013), des MAPK (Stivala et al., 2019) ou des kinases PIM (Mazzacurati et al., 2019) a permis d'améliorer l'efficacité du traitement dans divers modèles précliniques de NMP (Figure 9). Un essai clinique a ainsi été développé pour évaluer l'efficacité de la combinaison du ruxolitinib avec le buparlisib, un pan-PI3K inhibiteur, chez les patients atteints de MFP mais n'a pas démontré de bénéfices dans la prise en charge des patients (Durrant et al., 2019). De nouveaux essais cliniques combinant le ruxolitinib avec notamment des inhibiteurs de PI3K $\delta$ , une isoforme de PI3K préférentiellement exprimée dans les cellules hématopoïétiques, sont actuellement en cours de recrutement dans les MFP qui ont une réponse suboptimale au ruxolitinib (Tableau 4).

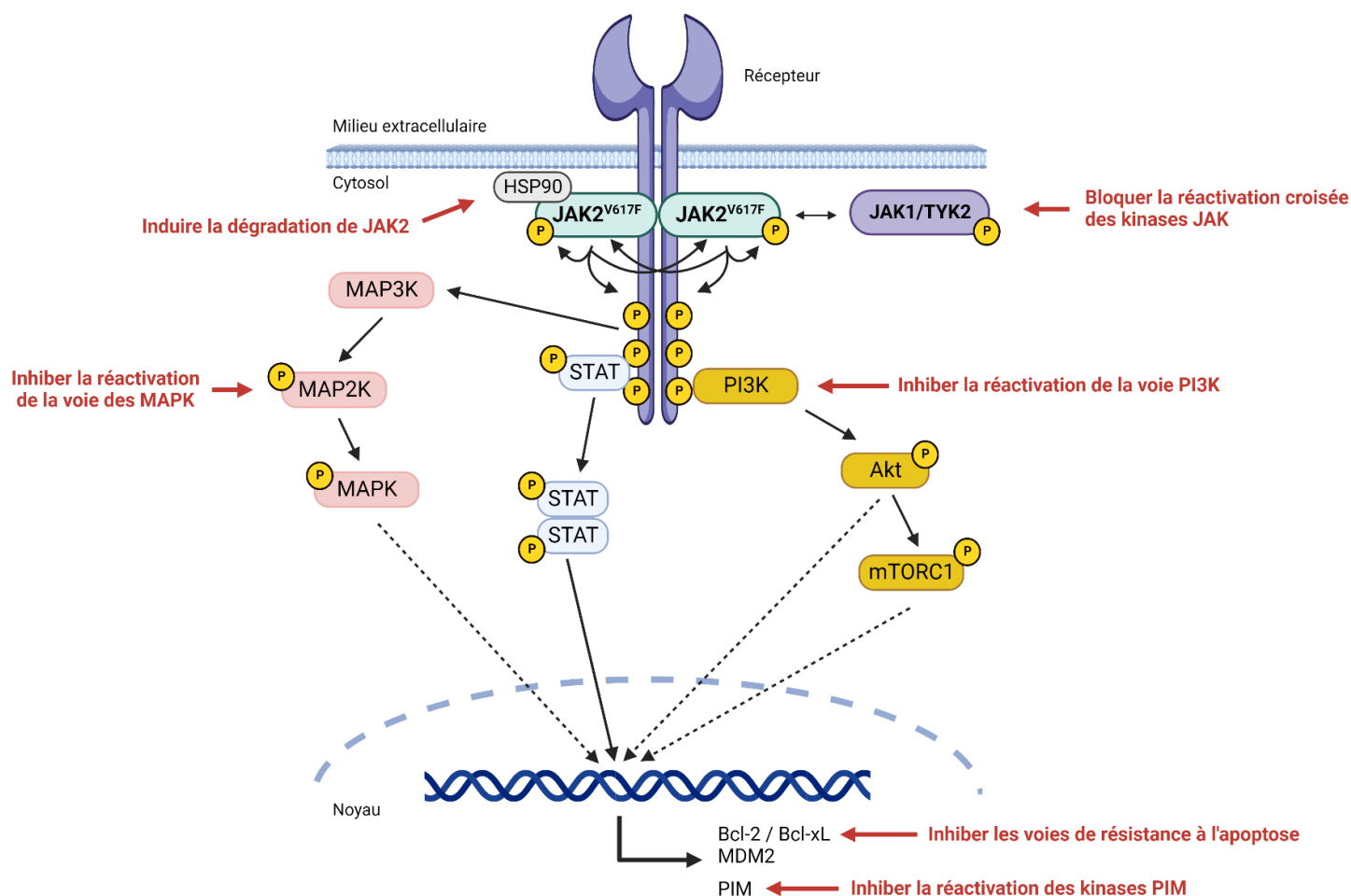
#### *c. Utilisation d'inhibiteurs de la stabilité de JAK2 :*

Dans le but de palier aux processus de réactivation de la signalisation dépendante de JAK2, une stratégie thérapeutique visant à induire la dégradation de cette kinase a été développée. La maturation et la stabilisation de JAK2 est dépendante de la protéine chaperonne HSP90 (« heat shock protein 90 ») (Marubayashi et al., 2010). Dans divers modèles de NMP *in vitro* et *in vivo*, l'inhibition de HSP90 diminue l'expression de JAK2 ainsi que sa signalisation en aval et réduit significativement la croissance du clone malin. De manière intéressante, ces effets ont été reproduits dans des cellules résistantes au ruxolitinib. De plus, la combinaison du ruxolitinib avec un inhibiteur de HSP90 permet d'améliorer le ciblage de JAK2 et a démontré une meilleure efficacité thérapeutique en améliorant notamment la spécificité du traitement vis-à-vis du clone malin (Bhagwat et al., 2014) (Figure 9). Cette stratégie thérapeutique est actuellement évaluée lors d'un essai clinique dans les MFP qui ont une réponse suboptimale au ruxolitinib (Tableau 4).



### 3. Ciblage des voies apoptotiques en combinaison avec le ruxolitinib :

Il a été montré qu'un traitement au ruxolitinib n'activait pas fortement les voies de mort cellulaire par apoptose (Mazzacurati et al., 2015). En effet, une inhibition de JAK2 augmente les niveaux d'expression de la protéine suppresseur de tumeurs p53 par un mécanisme impliquant la répression transcriptionnelle de MDM2 (Nakatake et al., 2012). La protéine p53 stimule l'apoptose en inhibant notamment les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL dont l'expression est également rapidement diminuée par un traitement avec un inhibiteur de JAK2<sup>V617F</sup> (Waibel et al., 2013). Cependant, les expressions de Bcl-2 et Bcl-xL sont augmentées suite à une exposition prolongée au ruxolitinib dans les cellules persistantes. Afin d'inhiber ce mécanisme de résistance, des stratégies de traitement par le ruxolitinib en combinaison avec un inhibiteur de Bcl-2/Bcl-xL ou de MDM2 ont été développées et permettent de cibler plus efficacement les cellules tumorales (Figure 9). Des essais sont en cours pour évaluer la pertinence clinique de ces double-thérapies (Tableau 4).



**Figure 9 : Représentation schématique des stratégies thérapeutiques identifiées pour améliorer l'efficacité du ruxolitinib dans les NMP.**

La résistance au ruxolitinib passe essentiellement par une réactivation de JAK2 et de sa signalisation en aval. Améliorer le ciblage de JAK2, inhiber sa cascade de signalisation en aval ou bloquer les voies de résistance à l'apoptose représentent des stratégies thérapeutiques identifiées comme pouvant améliorer l'efficacité du ruxolitinib dans les cellules porteuses de la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

Comme décrit précédemment, l'expression de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> induit de profonds changements favorisant la prolifération des cellules tumorales et le développement de la maladie. Cependant, les patients répondent peu à l'inhibition de JAK2<sup>V617F</sup> par le ruxolitinib en clinique. Ceci suggère l'implication de mécanismes compensatoires qui permettent aux cellules de s'adapter et survivre à l'inhibition de JAK2 par le ruxolitinib. L'autophagie est un processus catabolique essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire dans différentes conditions. Cette voie de dégradation est étroitement liée à la biologie des cancers où elle a notamment été impliquée dans la résistance des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. Dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, même si les données de la littérature sont éparses et souvent incomplètes, des études suggèrent que l'autophagie serait impliquée dans la résistance au ruxolitinib. Etudier sa régulation et son rôle en réponse au ruxolitinib pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des NMP JAK2<sup>V617F</sup>.

### **III. L'AUTOPHAGIE :**

#### **A. Généralités :**

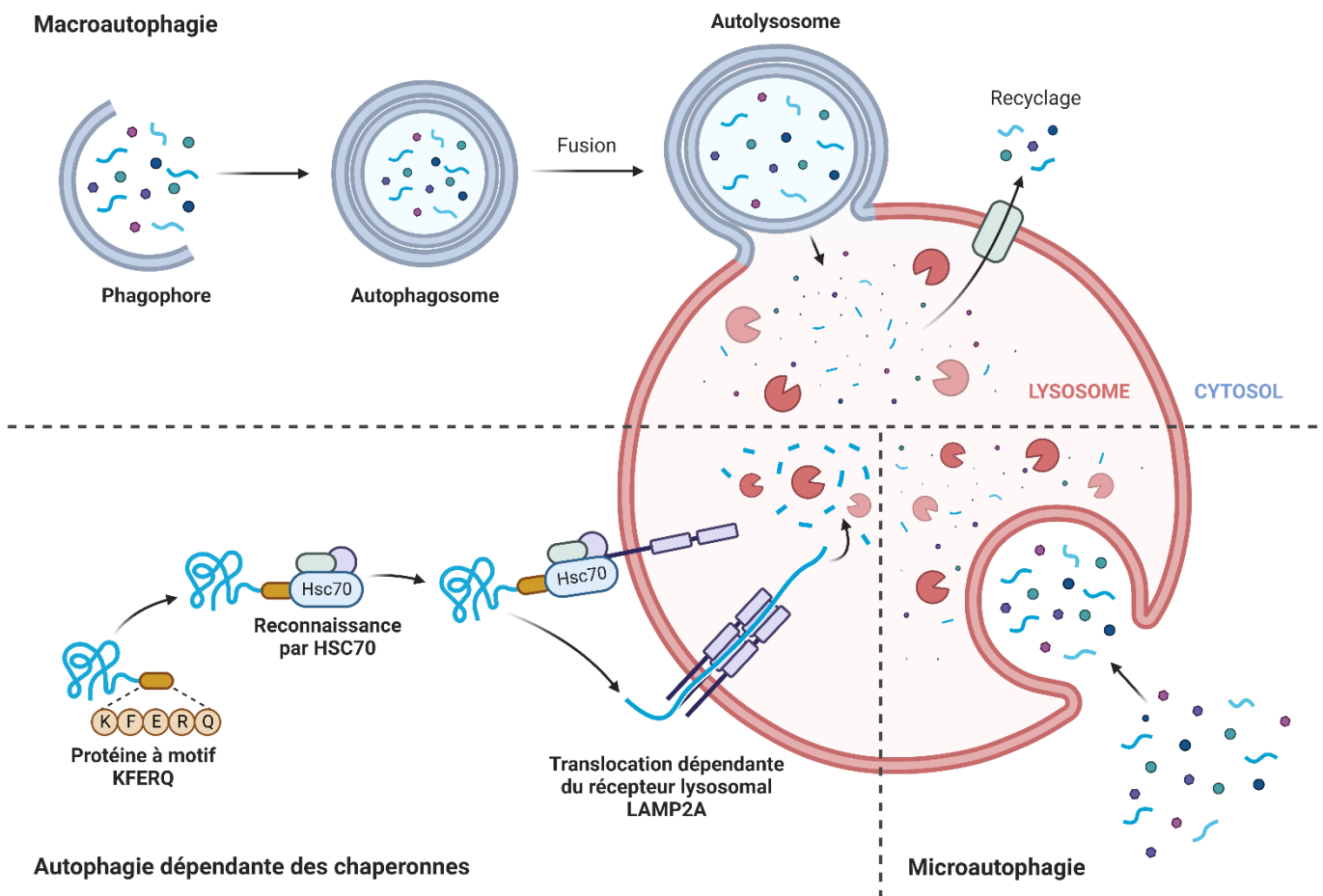
La vie des cellules qui composent notre organisme repose sur leur capacité à constamment maintenir un équilibre de différents paramètres qui permettent leur fonction. Cette homéostasie cellulaire est notamment assurée par la coordination entre la synthèse continue de nouvelles protéines et leur dégradation. L'énergie et les composés pour la synthèse de nouveaux constituants cellulaires sont principalement apportés par notre environnement. Mais lorsque celui-ci n'apporte plus suffisamment de nutriments, la première ligne de défense de la cellule carencée est de dégrader puis recycler ses propres composants pour assurer sa survie. La présence de mécanismes de dégradation et de recyclage apparaît alors essentielle à la cellule pour éliminer son matériel endommagé ou superflu et s'adapter le plus finement possible aux changements constants de son environnement.

Cependant, les mécanismes intracellulaires de dégradation pourraient s'avérer dangereux pour la survie des cellules s'ils dégradaient des quantités trop importantes de composants encore utiles à celles-ci. Pour cela, ils sont finement régulés dans le temps et l'espace par divers stimuli. En effet, la cellule possède des compartiments spécialisés dans la dégradation comme les lysosomes mis en évidence par le prix Nobel Christian de Duve dans les années 1950. Par la suite, les chercheurs observent que, sous certains stimuli, du matériel cytoplasmique est englobé dans des vésicules à double membrane et acheminé vers les lysosomes pour être dégradé. C'est en 1963 que Christian de Duve employa pour la première fois le terme autophagie, qui signifie littéralement « se manger soi-même », pour désigner ce mode d'adressage.

## 1. Définition de l'autophagie :

L'autophagie est définie comme un processus catabolique de dégradation lysosomale et de recyclage de composés cellulaires. Elle correspond à l'adressage dans le lysosome d'organites superflus ou endommagés, de protéines mal conformées, de fractions du cytosol ou même de pathogènes pour y être dégradés.

Trois types d'autophagie ont été décrits : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) et la macroautophagie qui correspond au processus initialement observé par Christian de Duve (Figure 10). Elles conduisent toutes à la dégradation du matériel cellulaire dans les lysosomes.



**Figure 10 : Représentation schématique des trois types d'autophagie.**

La macroautophagie correspond à la séquestration de matériel cytoplasmique par des autophagosomes qui fusionnent ensuite avec les lysosomes pour dégrader leur contenu. La CMA correspond à l'adressage sélectif de protéines à motif KFERQ aux lysosomes par la protéine chaperonne HSC70 et à leur translocation à l'intérieur des lysosomes par la protéine LAMP2A pour être dégradées. Enfin, la microautophagie est décrite comme étant une invagination directe de la membrane du lysosome pour internaliser et dégrader du matériel cytoplasmique.

## 2. La microautophagie :

Le transfert de composés cytosoliques vers le lysosome par invagination directe de la membrane du lysosome est appelé microautophagie (Li et al., 2012; Schuck, 2020). Ce processus permet la dégradation de matériel aléatoire mais aussi la dégradation sélective d'organites comme les peroxysomes, le RE, les mitochondries ou des fractions nucléaires. La microautophagie débute par la formation d'un tube qui s'invagine à partir de la membrane du lysosome. Une vésicule bourgeonne ensuite de ce tube pour être libérée dans la lumière vacuolaire et dégradée (Figure 10).

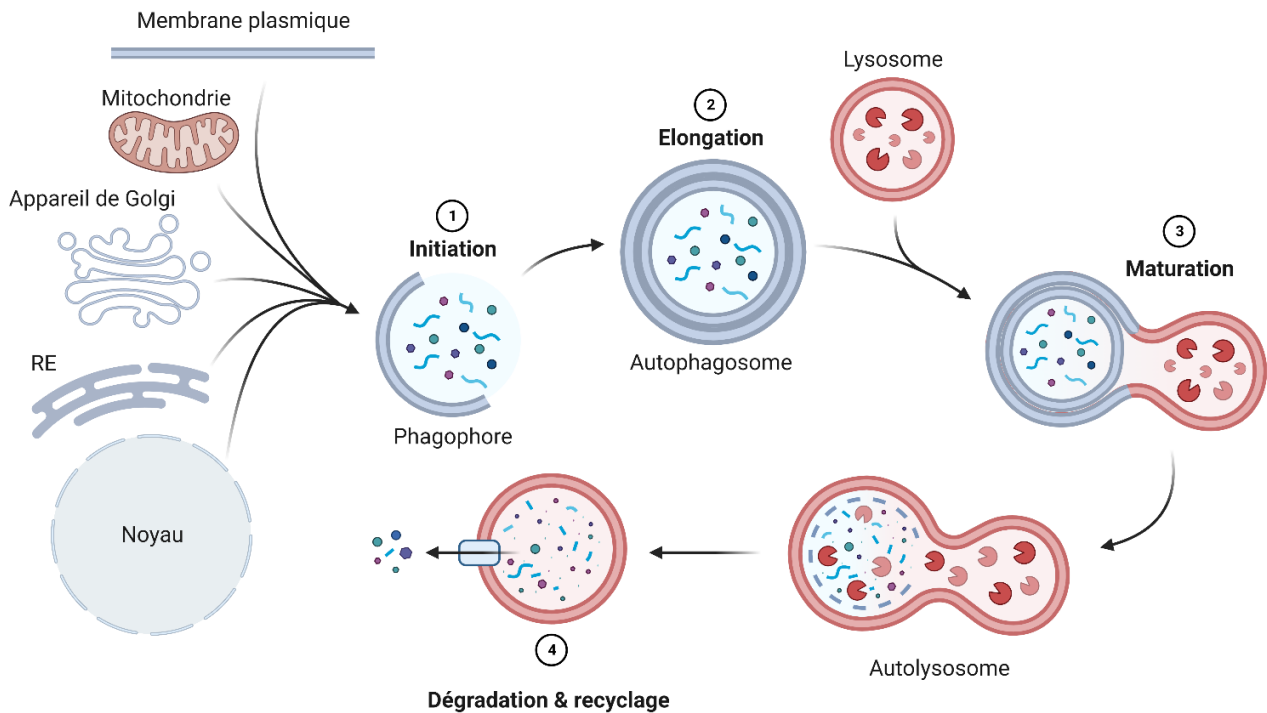
## 3. L'autophagie dépendante des chaperonnes :

La CMA est un mécanisme de dégradation sélectif par le lysosome de protéines cytosoliques présentant un motif consensus KFERQ (Kaushik and Cuervo, 2018) (Figure 10). Ces protéines sont ainsi reconnues par la protéine chaperonne cytosolique Hsc70 (« heat shock cognate 71kDa protein »). HSC70 va alors, en association avec d'autres chaperonnes, s'ancrer à la membrane lysosomale sur le récepteur LAMP2A (« lysosome-associated membrane protein 2A »), permettant ainsi l'adressage de la protéine substrat au lysosome. LAMP2A se multimérise alors pour former un complexe permettant la translocation de la protéine cargo vers la lumière du lysosome pour être dégradée alors que Hsc70 est recyclée. La CMA est un processus catabolique finement régulé qui participe au contrôle de nombreux processus cellulaires comme le métabolisme énergétique, la réparation de l'ADN et la réponse à divers stress. Des défauts de CMA avec l'âge ont également été associés à l'apparition de pathologies comme les maladies neurodégénératives ou les cancers.

## 4. La macroautophagie :

Enfin, la macroautophagie, qui sera par la suite désignée sous le nom d'autophagie, est le processus d'autophagie le plus étudié. Elle repose sur l'activité séquentielle de différentes protéines ATG très conservées de la levure aux mammifères. C'est un processus dynamique se déroulant en plusieurs étapes. L'autophagie débute par l'isolation d'une portion de membrane intracellulaire pour former un phagophore lors d'une étape d'initiation. Puis lors d'une étape d'élongation le phagophore s'invagine et s'allonge pour former une vésicule à double membrane appelée autophagosome qui va alors séquestrer de manière sélective ou non le matériel cytoplasmique à dégrader. Le processus d'autophagie se termine par une étape de maturation qui correspond à la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes pour former un autolysosome, aboutissant à la dégradation du matériel séquestré (Figure 11). C'est ce mode d'autophagie qui sera développé par la suite.

L'autophagie est un processus essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire, elle participe dans des conditions physiologiques à la dégradation et au recyclage de protéines ou organelles mal conformées ou superflues. En condition de stress, elle peut également être induite suite à une multitude de stimuli. L'autophagie est un mécanisme cellulaire central pour le maintien de l'homéostasie cellulaire, cependant lorsque le stress dépasse un certain seuil, elle a également été associée à des mécanismes de mort cellulaire. De ce fait, c'est un processus largement étudié pour son rôle en physiologie mais aussi dans de nombreuses pathologies comme les cancers où il peut être fortement dérégulé.



**Figure 11 : Les différentes étapes de la macroautophagie.**

La macroautophagie débute par la formation d'un phagophore à partir de membranes intracellulaires lors d'une étape d'initiation. Lors de l'élongation le phagophore se referme pour former une vésicule à double membrane ou autophagosome. Enfin, au cours d'une étape de maturation l'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour former un autolysosome. Le contenu des autophagosomes pourra alors être dégradé et recyclé par les enzymes lysosomales.

## B. Les acteurs moléculaires de l'autophagie :

### 1. Les protéines ATG :

Ce n'est que 30 ans après sa caractérisation morphologique que les mécanismes moléculaires de l'autophagie sont décrits par Yoshinori Ohsumi, qui sera récompensé du prix Nobel en 2016 pour ces travaux. A l'aide d'un criblage génétique chez la levure, il a sélectionné des mutants qui ne parviennent pas à générer des autophagosomes en condition de déprivation en azote et a donc mis évidence des protéines nécessaires au processus

d'autophagie, les protéines ATG (« autophagy related gene ») (Tsukada and Ohsumi, 1993). Depuis, de nombreux orthologues de ces protéines ont été identifiés chez les mammifères (Mizushima et al., 2011) (Tableau 5). Leurs fonctions dans la machinerie moléculaire de l'autophagie ont été largement étudiées, elles régulent dans le temps et l'espace les trois étapes majeures de ce processus que sont l'initiation, l'élongation et la maturation.

Complexe	Protéine	Fonction
<b>Etape d'initiation</b>		
Complexe d'initiation ULK	ULK1/2	Sérine/thréonine kinase
	ATG13	Module l'activité de ULK
	FIP200	Module l'activité de ULK
	ATG101	Sous-unité du complexe ULK
Complexe PI3 kinase de classe III	VPS34	PI3 kinase de classe III Phosphoryle le PIP2 en PIP3
	Beclin1	Sous-unité du complexe PI3K
	ATG14	Sous-unité du complexe PI3K
	VPS15	Sous-unité du complexe PI3K
	WIPI	Protéine liant le PIP3 Permet le recrutement de ATG16L
<b>Etape d'élongation</b>		
Complexe de conjugaison ATG12	ATG16L1/2	Permet le recrutement de la machinerie d'élongation
	ATG12	Se conjugue avec ATG5 Permet le recrutement de ATG3
	ATG5	Se conjugue avec ATG12 Permet le recrutement de ATG3
	ATG7	Permet la conjugaison ATG12-ATG5
	ATG10	Permet la conjugaison ATG12-ATG5
Complexe de conjugaison LC3	Protéines ATG8 : MAPLC3A/B/C GABARAP GABARAPL1/2/3	Se conjugue avec la PE  Abondante à la membrane des autophagosomes
	ATG4A-D	Maturation du pré-LC3 en LC3-I Recyclage du LC3-II en LC3-I
	ATG7	Permet la conjugaison ATG8-PE
	ATG3	Permet la conjugaison ATG8-PE
	ATG2	Transporteur de lipides

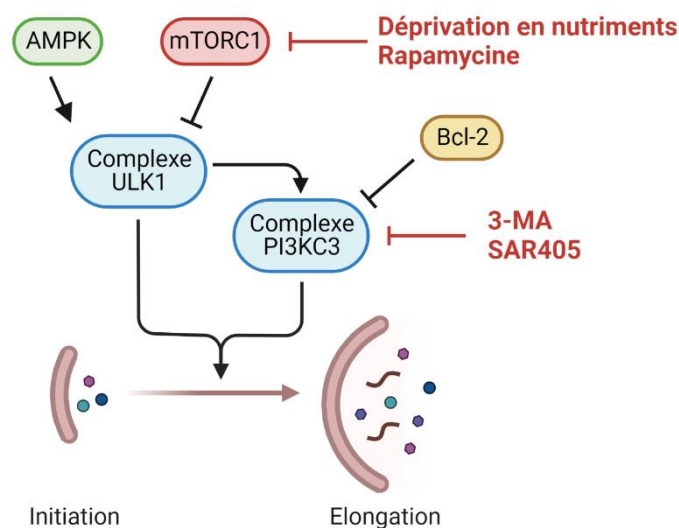
**Tableau 5 : Liste des principales protéines ATG impliquées dans la formation des autophagosomes chez les mammifères.**

(Adapté de Mizushima et al., 2011).

## 2. Les étapes du processus d'autophagie :

### a. L'initiation :

L'autophagie débute par un processus de formation d'un phagophore à partir de membranes intracellulaires comme le RE, les mitochondries, l'appareil de golgi ou la membrane plasmique (Figure 11). Cette étape est contrôlée par le complexe d'initiation composé chez les mammifères de ULK1, ATG13, FIP200 et ATG101 (Tableau 5). ULK1 (et son homologue ULK2) est la seule sérine/thréonine kinase parmi les protéines ATG. Elle est régulée positivement par AMPK (« 5' AMP-activated protein kinase ») et négativement par mTORC1 (Figure 12).



**Figure 12 : Représentation schématique des bases moléculaires de l'initiation de l'autophagie.** Les complexes ULK1 et PI3K de classe III contrôlent les étapes précoces de l'initiation de l'autophagie. Ils sont régulés positivement par la kinase AMPK et négativement par mTORC1 et la protéine Bcl-2. (Abréviations : PI3KC3 : PI3K de classe III).

Plusieurs méthodes couramment utilisées pour activer le flux autophagique ciblent le complexe d'initiation ULK1. C'est le cas de la carence en nutriments qui active l'autophagie par un mécanisme dépendant d'une inhibition de mTORC1. Il est également possible d'activer l'autophagie à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques de mTORC1 comme la rapamycine.

Le complexe PI3K de classe III composé de protéines essentielles à la poursuite du processus d'autophagie est ensuite recruté, il est composé de VPS34 qui porte l'activité PI3K, ATG14, Beclin1 et VPS15 (Tableau 5). Ce complexe est notamment régulé par ULK1 qui le phosphoryle à plusieurs niveaux. Par ailleurs, l'activité du complexe PI3K de classe III est régulée par l'interaction inhibitrice de Beclin1 avec la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Pattingre et al., 2005) (Figure 12). Le complexe formé par VPS34 permet la production de PIP3 qui s'accumule au niveau d'une portion membranaire alors appelée omégasome. Ce lipide phosphorylé servira de signal pour le recrutement de protéines de la famille WIPI (« WD-repeat

interacting with phosphoinositides »). Des études suggèrent que les protéines WIPI sont impliquées dans l'alimentation du phagophore en lipides essentiels à sa croissance et dans le recrutement de la machinerie d'élongation.

Plusieurs inhibiteurs de l'autophagie ciblant le processus d'initiation ont été développés et sont intensivement utilisés. C'est par exemple le cas de la 3-méthyladénine (3-MA) ou du SAR405 qui inhibent VPS34 et bloquent la formation des autophagosomes.

### *b. L'élongation :*

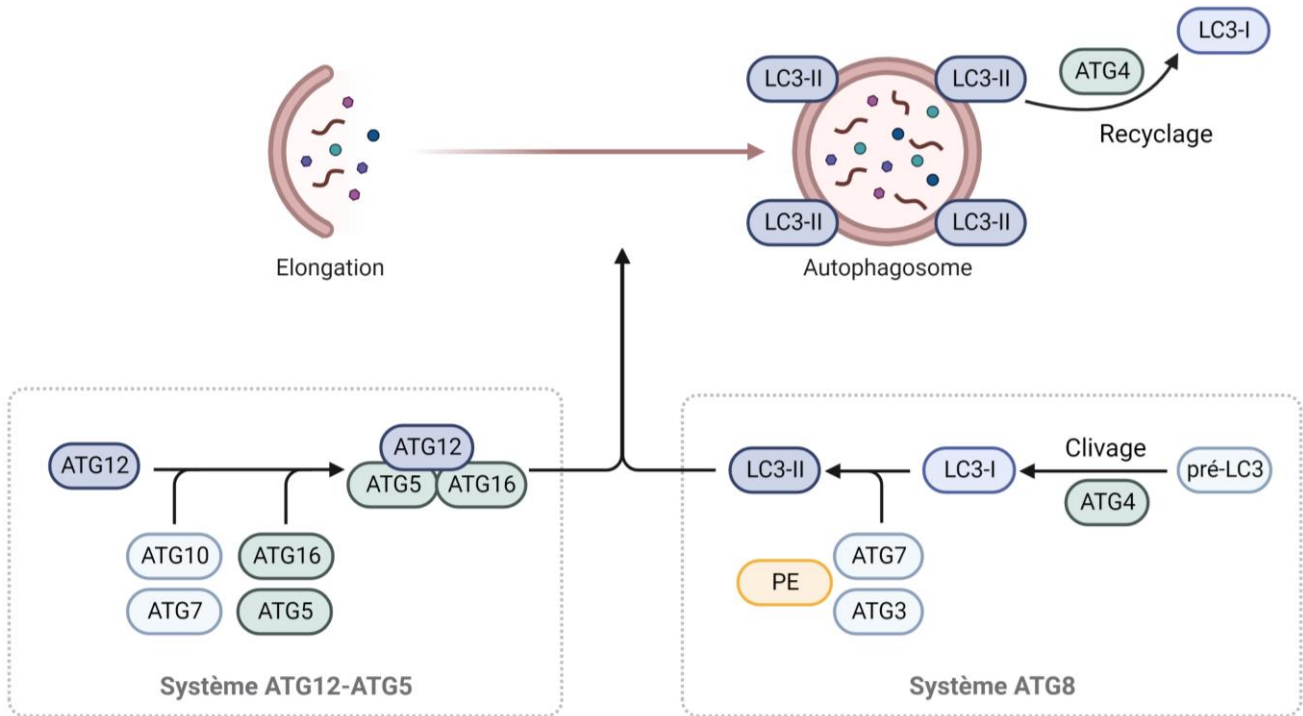
Le système d'élongation a pour fonction principale de permettre le recrutement de la protéine LC3 à la membrane du phagophore qui pourra alors s'allonger et former un autophagosome (Figure 11). ATG16L1 interagit avec WIPI et permet la localisation de la machinerie d'élongation au phagophore. Cette élongation du phagophore est dépendante de deux systèmes de conjugaison que sont les complexes ATG5-ATG12-ATG16L1 et le complexe de conjugaison de ATG8 à la phosphatidyléthanolamine (PE) (Tableau 5).

Le premier système correspond à la conjugaison de ATG12 à ATG5 par un processus dépendant des protéines ATG7 et ATG10. Le complexe ATG12-ATG5 interagit avec ATG16L1 et est recruté principalement à la membrane externe de l'autophagosome puis se dissocie avant que celui-ci ne soit complètement formé, il participe au second système de conjugaison de ATG8 avec la PE (Figure 13).

Dans le second système de conjugaison, il existe plusieurs protéines de la famille ATG8 chez les mammifères comme MAPLC3A/B/C (« microtubule associated proteins light chain 3 », ci-dessous nommé LC3), GABARAP (« gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein ») et GABARAPL1/2 (« GABARAP-like »). Nous prendrons ici l'exemple de la protéine LC3. LC3 est synthétisé sous la forme d'un précurseur (pré-LC3) qui sera clivé par ATG4 pour être maturé en LC3-I. Le pré-LC3 et le LC3-I sont localisés de manière diffuse dans le cytosol. Puis les actions successives de ATG7 et ATG3 permettent la liaison covalente de LC3-I avec une PE pour former le LC3-II lié à la membrane de l'autophagosome en cours d'élongation (Figure 13). Le complexe ATG12-ATG5 facilite la formation de LC3-II en permettant le recrutement de ATG3.

Ainsi le suivi de l'accumulation de LC3-II sur les autophagosomes est considéré comme un excellent marqueur pour évaluer l'autophagie dans les cellules (Klionsky et al., 2021). Contrairement au complexe ATG12-ATG5, LC3-II reste associé à l'autophagosome, il sera cependant clivé par ATG4 pour être recyclé en LC3-I avant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Figure 13). L'élongation de l'autophagosome est également dépendante de l'action de la protéine ATG2 qui sert de transporteur de lipides pour alimenter la double membrane de l'autophagosome grandissant à partir de membranes ou de gouttelettes lipidiques adjacentes (Osawa, 2019; Velikkakath et al., 2012).



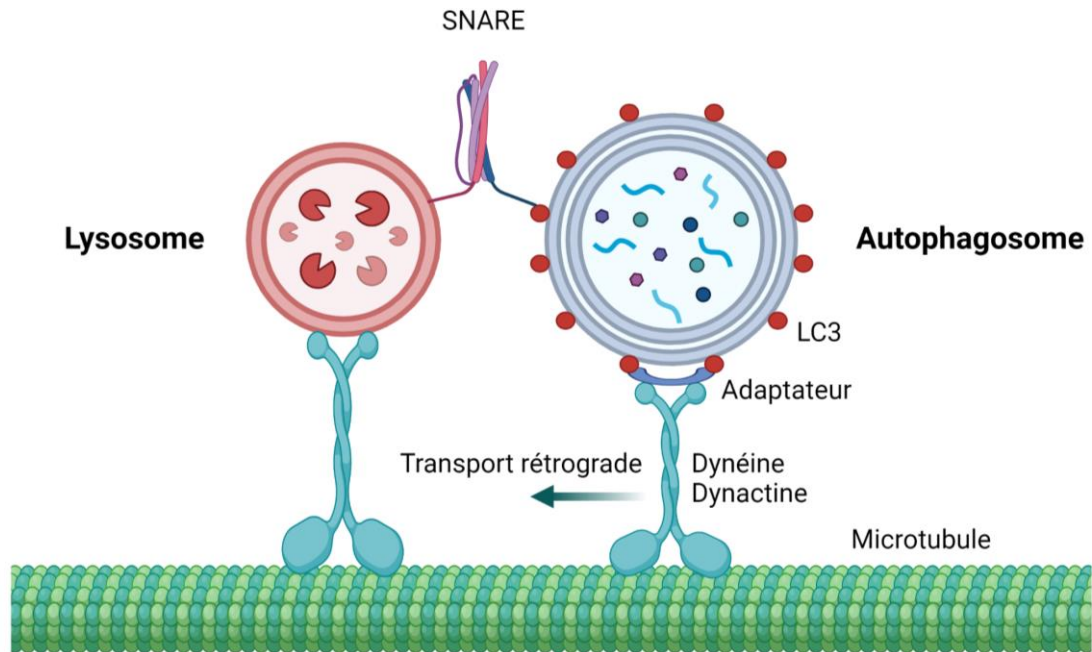


**Figure 13 : Les systèmes d'élongation de l'autophagie.**

Les deux systèmes de conjugaison ATG12-ATG5 et ATG8-PE sont impliqués dans l'élongation du phagophore pour former un autophagosome.

### *c. La maturation :*

Une fois formé, l'autophagosome fusionne avec des lysosomes pour donner un autolysosome. Le lysosome apporte ainsi les enzymes fonctionnant à pH acide nécessaires à la dégradation du contenu des autophagosomes. La rencontre entre les autophagosomes et les lysosomes est médiée par plusieurs protéines. Le transport de ces vésicules est assuré par le réseau des microtubules et leurs protéines motrices associées. Les kinésines permettent le transport vers la périphérie alors que les complexes dynéine-dynactine transportent les vésicules vers la région périnucléaire, site préférentiel de localisation des lysosomes. Grâce à l'interaction de divers adaptateurs comme les petites GTPases de la famille RAB, les protéines motrices sont capables de reconnaître et de s'ancrer à LC3 ou GABARAP à la surface de l'autophagosome. Ainsi, les autophagosomes peuvent se déplacer sur les microtubules. Le rapprochement final est médié par des facteurs d'attachement de la famille SNARE (« soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor ») (Lőrincz and Juhász, 2020) (Figure 14).



**Figure 14 : Mécanisme de fusion de l'autophagosome avec le lysosome.**

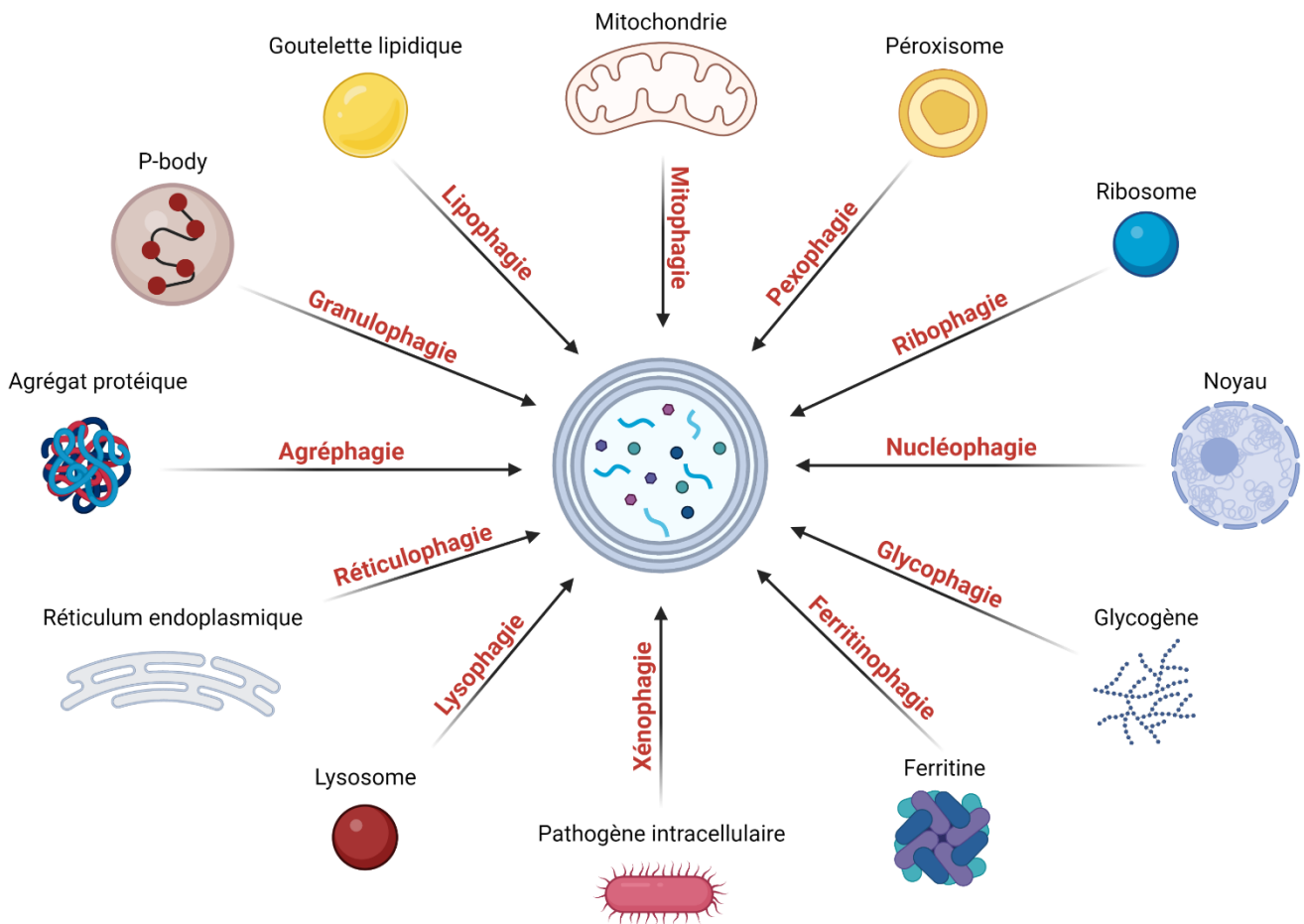
Le rapprochement des deux vésicules est dépendant du transport rétrograde des autophagosomes à la surface des microtubules. La fusion est ensuite médiée par les facteurs d'attachement SNARE.

Des inhibiteurs de l'autophagie bloquant la dégradation lysosomale du contenu des autophagosomes sont également utilisés de manière extensive. C'est par exemple le cas de la chloroquine, un agent lysosomotropique qui s'accumule dans les compartiments cellulaires acides et élève leur pH en piégeant les protons, conduisant à une inhibition des enzymes lysosomales qui agissent normalement à pH acide. Un autre inhibiteur largement utilisé est la bafilomycine A1, un inhibiteur de la pompe à protons vacuolaire V-ATPase qui conduit également à une neutralisation du pH des lysosomes et donc à un blocage de l'action des enzymes lysosomales.

### 3. Les mécanismes de dégradation sélective par autophagie :

Bien que l'autophagie ait été initialement décrite comme un processus de dégradation aléatoire, plusieurs mécanismes régulant la digestion spécifique d'organites ou de protéines cargo ont été décrits. Cette dégradation sélective est médiée par le recrutement dans l'autophagosome au niveau de LC3-II de protéines possédant un motif consensus LIR (« LC3 interacting region »). Le recrutement peut être direct si le cargo est une protéine qui contient un LIR ou médié par une protéine dite « réceptrice » tel que p62, NBR1 ou OPTN qui contiennent des motifs LIR. Il aboutit à la localisation du cargo et de son récepteur éventuel à l'intérieur des autophagosomes puis à leur dégradation par les enzymes lysosomales. De

nombreuses voies de dégradation sélective de protéines ou d'organelles ont été décrites (Gatica et al., 2018; Klionsky et al., 2021; Lamark and Johansen, 2021) (Figure 15).



**Figure 15 : Principales voies décrites d'autophagie sélective.**

La dégradation sélective par autophagie de nombreux constituants cellulaires a été décrite. Cette spécificité est généralement permise par l'existence de différentes protéines réceptrices qui permettent un adressage sélectif du cargo dans les autophagosomes.

## C. La mesure de l'autophagie :

### 1. Les principales techniques pour monitorer l'autophagie :

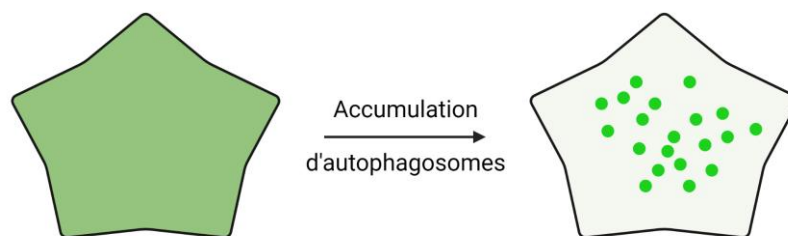
#### a. La microscopie électronique :

L'autophagie a été détectée pour la première fois dans les années 1950 par microscopie électronique à transmission. Cette technique présente l'avantage de révéler la morphologie et parfois le contenu des structures autophagiques mais aussi leur localisation précise parmi les autres composants cellulaires avec une résolution de l'ordre du nanomètre. La visualisation

de la localisation précise de protéines d'intérêt au niveau de l'autophagosome est également possible par une technique « immunogold » à l'aide d'anticorps couplés à des billes d'or.

### *b. La microscopie à fluorescence :*

Le marquage de la protéine LC3 est couramment utilisé pour visualiser les autophagosomes. En microscopie à fluorescence, il est possible d'utiliser des anticorps reconnaissant LC3 ou bien de surexprimer dans les cellules un LC3 fusionné à sa partie N-terminale avec une protéine fluorescente comme la GFP. En condition basale, la localisation majoritairement cytosolique de LC3-I génère un signal diffus. A l'inverse, lorsque l'autophagie est induite, le LC3-I est converti en LC3-II et se concentre au niveau des autophagosomes, le marquage LC3 devient alors un signal punctiforme (Figure 16).

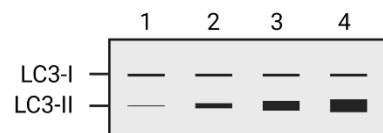


**Figure 16 : Représentation schématique du marquage de la protéine LC3 pour visualiser une accumulation d'autophagosomes par immunofluorescence.**

L'accumulation d'autophagosomes entraîne un passage d'un signal de LC3 diffus à un marquage punctiforme.

### *c. Le western blot :*

De la même manière, il est possible de suivre par une approche biochimique de western blot les niveaux de LC3 sous sa forme cytosolique (LC3-I) et sous sa forme liée aux autophagosomes (LC3-II). En effet, la conjugaison de LC3 avec une PE induit un changement des propriétés isoélectriques de la protéine qui se traduit par une migration électrophorétique différentielle de LC3-II par rapport à LC3-I (Figure 17).

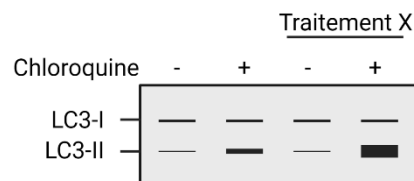


**Figure 17 : Schématisation du suivi de la conversion du LC3-I en LC3-II par western blot.**

L'accumulation d'autophagosomes entraîne la conversion du LC3-I cytosolique en LC3-II lié aux membranes des autophagosomes. On observe dans cet exemple une augmentation du signal LC3-II dans les conditions 2, 3 et 4 par rapport à la condition 1 qui peut être interprétée comme une accumulation d'autophagosomes dans les dernières conditions.

## 2. La détermination du flux autophagique :

Un point critique dans l'étude de l'autophagie est qu'il s'agit d'un processus hautement dynamique qui peut être régulé à plusieurs niveaux. Une accumulation d'autophagosomes peut donc indiquer une augmentation de leur biogenèse ou à l'inverse un blocage de leur dégradation. Pour pallier à ce problème majeur, les méthodes pour monitorer l'autophagie doivent prendre en compte la notion de flux autophagique. Les méthodes principalement utilisées pour déterminer le flux autophagique sont celles suivant la protéine LC3 par western blot ou immunofluorescence. LC3-II étant dégradé dans les autophagosomes, l'ajout d'un inhibiteur de la dégradation du contenu des autophagosomes comme la chloroquine ou la bafilomycine A1 va arrêter le flux et conduire à l'accumulation de LC3-II. Il est alors possible de suivre cette accumulation pendant le laps de temps où le flux est arrêté par western blot (accumulation de LC3-II) ou par immunofluorescence (signal LC3 punctiforme). Ces différentes techniques permettent de quantifier l'accumulation de LC3-II en fonction de divers traitements et donc de déterminer si le flux autophagique est stimulé ou inhibé dans ces conditions (Klionsky et al., 2021) (Figure 18).



**Figure 18 : Représentation schématique du calcul du flux autophagique par western blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant la protéine LC3.**

Dans les conditions sans traitement X, le blocage de l'autophagie par la chloroquine entraîne une accumulation de la protéine LC3-II. Cette accumulation est le reflet du flux autophagique de base dans les cellules. Sous traitement par la molécule X, la chloroquine entraîne une accumulation plus importante de LC3-II que dans les conditions basales. Ceci signifie que le traitement X augmente le nombre d'autophagosomes et donc le flux autophagique dans les cellules.

Une autre méthode pour prendre en compte ce flux est de pouvoir distinguer les autophagosomes des autolysosomes grâce à l'utilisation de la construction RFP-GFP-LC3. L'ancrage du LC3-II au niveau des autophagosomes permet la localisation des deux signaux RFP et GFP au niveau de ces vésicules. Or, le signal GFP est sensible aux conditions acides rencontrées dans les lysosomes alors que la RFP est stable dans ces conditions. Ainsi la visualisation par microscopie à fluorescence de la colocalisation entre les deux signaux indique un autophagosome qui n'a pas fusionné avec les lysosomes alors qu'un compartiment uniquement positif pour le signal de la RFP correspond à un autolysosome.

### 3. Autres techniques fréquemment utilisées :

Certaines protéines ont été identifiées comme étant dégradées par le processus d'autophagie. Suivre leurs niveaux d'expression peut alors refléter l'activité autophagique. C'est par exemple le cas de p62 où une diminution de son expression protéique indiquera une augmentation de l'autophagie.

Il est également possible de suivre l'activité d'enzymes cargo décrites pour être dégradées par autophagie comme la lactate déshydrogénase (LDH). Cette technique consiste à fractionner les cellules en un compartiment soluble et un compartiment insoluble qui contient les autophagosomes et à mesurer l'activité de la LDH dans ces deux fractions en présence d'inhibiteurs de la dégradation des autophagosomes (e.g. chloroquine). Ainsi, une augmentation de l'autophagie se traduira par une augmentation de l'activité enzymatique de la LDH dans la fraction insoluble.

De la même manière, les protéines à longue durée de vie sont connues pour être dégradées par le processus d'autophagie. Ainsi, mesurer leur vitesse de dégradation suite à l'incorporation d'isotopes radioactifs représente une méthode couramment utilisée pour mesurer le flux autophagique (Bauvy et al., 2009).

Ces trois méthodes permettent d'évaluer le flux autophagique indépendamment de la quantité de LC3 présente dans la cellule qui peut, dans certains cas, ne pas être représentative du niveau d'autophagie.

Il est également possible de mesurer la quantité d'autophagosomes par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 sur des cellules fixées. La cytométrie en flux n'apporte cependant pas d'information de localisation subcellulaire nécessaire pour distinguer le signal de la protéine LC3-II localisée aux autophagosomes. Cette technique nécessite donc une étape préalable d'élimination du signal LC3-I afin de mesurer spécifiquement le signal de LC3-II situé aux autophagosomes. Afin de pallier à cette limitation, un outil couplant la cytométrie en flux avec la microscopie à fluorescence a été développé. Cette approche dite d'imagerie en flux (ou « ImageStream ») permet une analyse quantitative de populations cellulaires en cytométrie en flux tout en apportant une information spatiale sur le signal. L'analyse du signal LC3 par imagerie en flux permet ainsi de suivre le marquage punctiforme spécifique du LC3-II localisé aux autophagosomes et donc de mesurer finement l'autophagie à l'échelle de populations cellulaires.

Enfin, une méthode classique pour mesurer l'autophagie est le marquage avec des colorants spécifiques des compartiments acides comme l'acridine orange ou le LysoTracker Red. Ces traceurs longtemps utilisés sont cependant limités par le fait qu'ils détectent premièrement les lysosomes. Un kit commercial appelé Cyto-ID de mesure de l'autophagie à l'aide d'un colorant plus spécifique des autophagosomes a également été développé. Cet outil permet ainsi de mesurer le flux autophagique par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux.

## D. Voies de signalisation régulant l'autophagie :

L'autophagie permet aux cellules de répondre à un large spectre de signaux intra- et extracellulaires comme des carences en nutriments, la déprivation en facteurs de croissance, l'hypoxie ou le stress du RE. Ces signaux induisent des modifications dans les cascades de signalisation qui convergent pour la plupart vers le complexe sérine/thréonine kinase mTORC1, le principal régulateur de l'autophagie dans les cellules.

### 1. Régulation de l'autophagie par le stress métabolique :

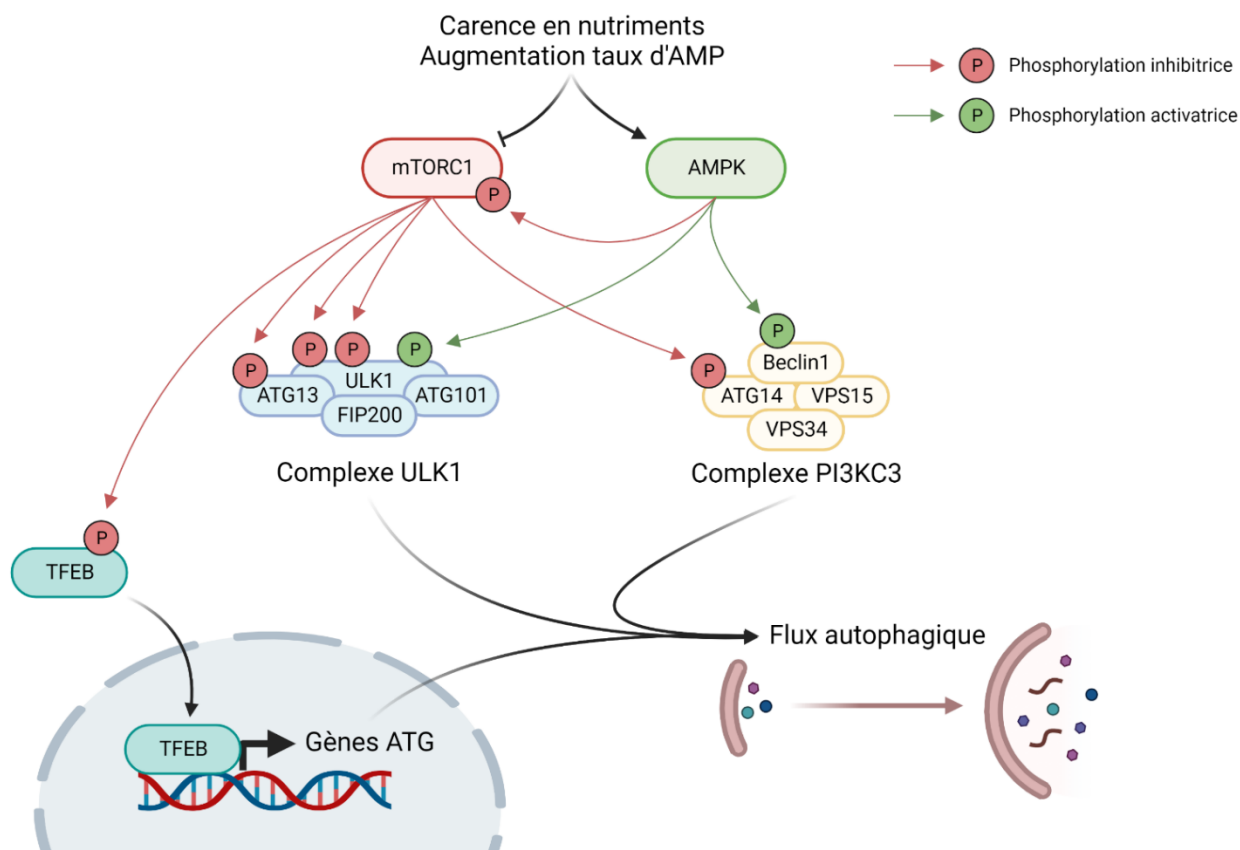
L'implication de l'autophagie dans la réponse à une déprivation en nutriments est connue de longue date (Mortimore and Ward, 1976). Il est aujourd'hui connu que mTORC1 est le principal centralisateur des signaux senseurs de la disponibilité intracellulaire en acides aminés. mTORC1 est un régulateur majeur de la croissance cellulaire et de la prolifération, il agit en stimulant divers processus anaboliques comme la biosynthèse de protéines, de lipides et d'organites et en limitant les processus cataboliques comme l'autophagie.

Ce complexe à activité sérine/thréonine kinase régule l'autophagie en contrôlant principalement l'activité du complexe d'initiation ULK1 en le phosphorylant sur des sites inhibiteurs comme les résidus sérine 638 et 757. mTORC1 phosphoryle également la protéine ATG13 pour bloquer son interaction avec ULK1 et ainsi inhiber le complexe d'initiation de l'autophagie. Un autre mécanisme de régulation de l'autophagie par mTORC1 passe par une inhibition directe du complexe PI3K de classe III. En effet, lorsqu'il est activé mTORC1 phosphoryle la protéine ATG14 pour inhiber l'activité de la kinase VPS34 (Yuan et al., 2013) (Figure 19). Enfin, mTORC1 régule négativement l'autophagie au niveau transcriptionnel en phosphorylant le facteur de transcription TFEB (« transcription Factor EB ») pour le séquestrer dans le cytosol. Lorsque mTORC1 est inhibé, la translocation de TFEB dans le noyau active la transcription d'un ensemble de gènes de l'autophagie notamment (Settembre et al., 2011) (Figure 19).

Lorsque la quantité en acides aminés est suffisante, mTORC1 est activé et pourra alors activer les processus anaboliques et réprimer l'autophagie. En revanche, en condition de carence, mTORC1 est inhibé, l'activation de ULK1 qui en découle conduit à une activation du processus d'autophagie. Cette autophagie induite permet la dégradation et le recyclage de protéines et restaure des quantités en acides aminés suffisantes pour permettre la survie des cellules. Certaines études établissent également un rôle de protéines phosphatases comme PP2A dans la levée de l'inhibition par mTORC1 des protéines ULK1, ATG13 ou TFEB en condition de carence en nutriments (Memisoglu et al., 2019; Wong et al., 2015; Yeasmin et al., 2016).

En condition de stress métabolique, caractérisé par une réduction de la disponibilité en ATP et une augmentation des taux d'AMP, la sérine/thréonine kinase AMPK est activée.

L'autophagie est régulée en aval de AMPK par deux mécanismes. D'une part, AMPK phosphoryle et inhibe mTORC1, ce qui conduit à une levée de l'inhibition de ULK1. D'autre part, AMPK phosphoryle directement ULK1 sur son résidu sérine 555 pour l'activer et initier un processus d'autophagie. Il a également été démontré que AMPK régulait l'autophagie en activant directement le complexe PI3K de classe III via la phosphorylation activatrice de Beclin1 (Kim et al., 2013) (Figure 19). L'inhibition de mTORC1 et l'activation de l'autophagie en aval de AMPK contribuent à une restauration de la balance énergétique et des taux d'ATP intracellulaires.



**Figure 19 : Régulation coordonnée de l'autophagie par mTORC1 et AMPK en réponse à un stress métabolique.**

En condition basale, AMPK est inhibé et mTORC1 phosphoryle différentes protéines ATG pour inhiber l'autophagie. En condition de carence, le blocage de mTORC1 lève cette inhibition de l'autophagie. De plus, un stress métabolique active la kinase AMPK qui pourra alors phosphoryler des protéines ATG pour stimuler le flux autophagique.

## 2. Régulation de l'autophagie par la voie de la réponse intégrée au stress :

La réponse intégrée au stress (ISR) est une voie de signalisation activée en réponse à divers stimuli comme l'hypoxie, des carences, des infections ou le stress du RE (Pakos-Zebrucka et al., 2016). L'activation de l'ISR diminue la synthèse globale de protéines et active



un programme d'expression de gènes pour optimiser la réponse des cellules au stress rencontré et restaurer l'homéostasie cellulaire. L'ensemble des stimuli qui activent l'ISR convergent vers la phosphorylation du facteur eucaryotique d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (« eukaryotic translation initiation factor 2A ») sur la sérine 51 (Ron, 2002). Cette phosphorylation est médiée par 4 kinases en fonction du stimulus rencontré. Lors d'une infection, la présence d'ARN double brin dans la cellule active l'ISR *via* la kinase PKR (« double-stranded RNA-dependent protein kinase ») (Clemens and Elia, 1997). La kinase PERK (« PKR-like ER kinase ») phosphoryle eIF2 $\alpha$  en présence d'un stress du RE, causé par l'accumulation de protéines mal conformées (Harding et al., 1999). Elle reconnaît également des perturbations de la balance énergétique, de l'équilibre du calcium ou du statut des ROS. La kinase GCN2 (« general control non-depressible protein 2 ») active l'ISR lors d'une carence en acides aminés (Vazquez de Aldana et al., 1994). Enfin, la kinase HRI (« heme-regulated eIF2 $\alpha$  kinase ») est exprimée essentiellement dans les cellules érythroïdes où elle est impliquée dans le processus de différenciation (Han et al., 2001). Dans ces cellules, l'ISR est activée par HRI en condition de carence en fer et permet de coordonner la production de l'hémoglobine avec la biodisponibilité en hème. A l'inverse, des phosphatases sont impliquées dans l'inactivation de eIF2 $\alpha$  et permettent de terminer l'ISR et de retourner à un fonctionnement cellulaire normal (Novoa et al., 2001).



**Figure 20 : Régulation de l'autophagie par la voie de la réponse intégrée au stress.**

La phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  suite à différents stress conduit à un blocage de la traduction globale et favorise la traduction ou l'expression d'un sous-type de protéines dont les facteurs de transcription CHOP et ATF4. Ces facteurs activent alors des programmes transcriptionnels impliqués dans la réponse cellulaire au stress dont notamment l'expression d'un ensemble de gènes de l'autophagie.

Lorsque l'ISR est activée, la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  bloque la traduction globale des protéines tout en favorisant celle d'un certain sous-type de protéines comme les facteurs de transcription ATF4 et CHOP qui coopèrent pour réguler notamment l'expression d'un

ensemble de gènes de l'autophagie (B'chir et al., 2013) (Figure 20). L'activation de l'autophagie par l'ISR favorise la restauration de l'homéostasie cellulaire et la survie de par son rôle dans la dégradation de protéines mal conformées, d'organelles endommagées ou de pathogènes. Elle apporte ainsi les nutriments et constituants de base nécessaires à la survie de la cellule en condition de stress.

De manière intéressante, dans la biologie de certains cancers il a été montré que l'activation d'oncogènes pouvait induire une activation de l'ISR qui favorise alors le processus de tumorigenèse (Denoyelle et al., 2006; Hart et al., 2012). Par ailleurs, les CSH présentent une autophagie élevée nécessaire au maintien de leurs fonctions (Mortensen et al., 2011). Il a également été montré que dans ces cellules l'ISR était activée (van Galen et al., 2018). Les niveaux élevés d'ATF4 contribueraient à l'élévation de l'autophagie dans les CSH.

### 3. Régulation de l'autophagie par les facteurs de croissance et les cytokines :

#### *a. Régulation de l'autophagie par la voie PI3K/AKT :*

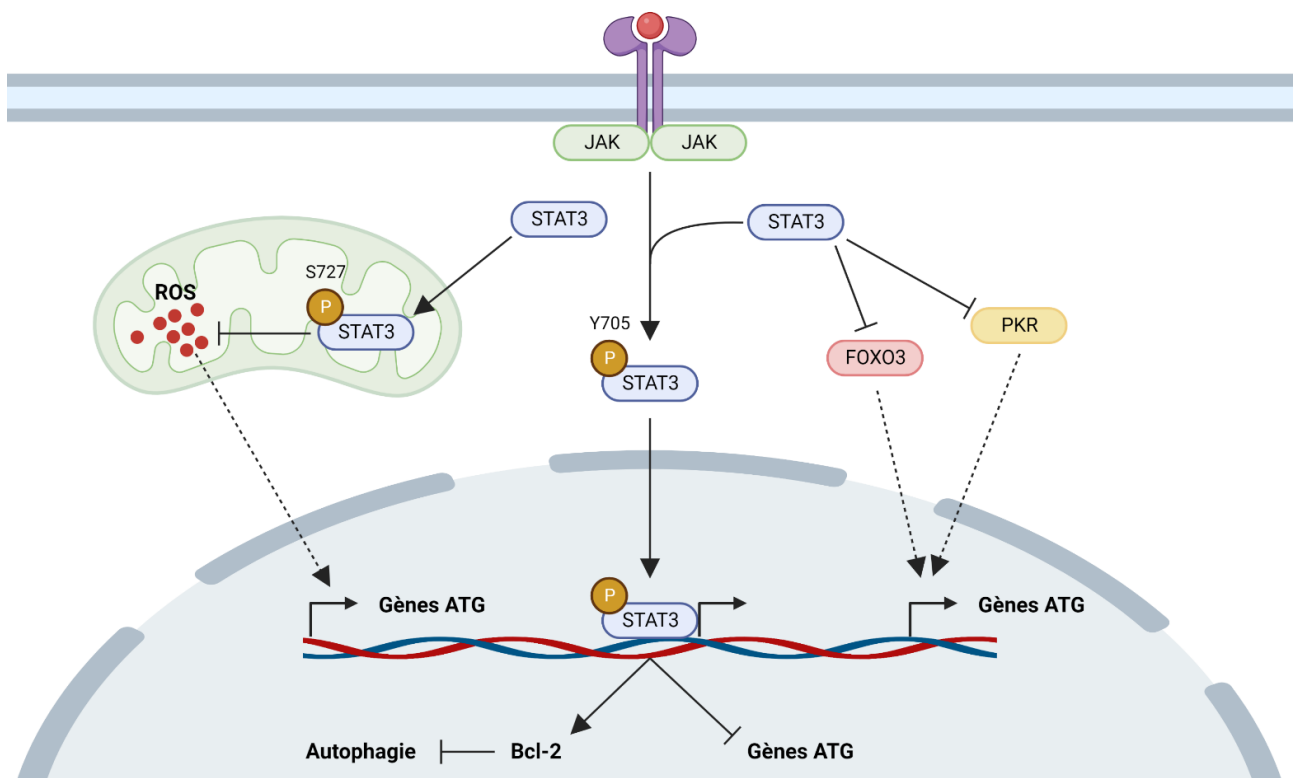
Les facteurs de croissance comme l'insuline ou certaines cytokines convergent vers une activation de la voie PI3K de classe I/AKT/mTORC1 et régulent ainsi négativement l'autophagie. En revanche, il a été montré que les facteurs de transcription FOXO3 et GATA1, respectivement réprimé et activé par AKT étaient tous les deux capables d'induire la transcription de gènes de l'autophagie. Dans les cellules myéloïdes, les niveaux d'expression de ces deux facteurs de transcription sont dépendants de l'état de différenciation des cellules. Il apparait en effet que la signalisation de AKT dépendante de l'EPO réprime FOXO3 et la transcription de gènes de l'autophagie dans les cellules les moins différenciées. Or, dans les étapes de différenciation terminale, l'expression de GATA1 est augmentée, AKT stimule alors la transcription des cibles de GATA1 dont des gènes de l'autophagie (Bakker et al., 2007). Cette induction de l'autophagie dépendante de GATA1 est nécessaire au bon déroulement de l'érythropoïèse terminale (Kang et al., 2012).

#### *b. Régulation de l'autophagie par les facteurs STAT :*

L'activation de JAK2 par les cytokines régule positivement l'activité des facteurs STAT1, STAT3 et STAT5. Bien que peu de liens soient établis entre STAT5 et autophagie, il a été démontré que STAT1 régulait négativement l'expression de ULK1 et donc l'autophagie (Goldberg et al., 2017). Une littérature plus étoffée établit un rôle de STAT3 dans la régulation de l'autophagie par des mécanismes qui dépendent de son rôle de facteur de transcription ou non (You et al., 2015) (Figure 21). Ce rôle de STAT3 est ambivalent et dépend du contexte dans lequel on l'étudie. En condition basale, le STAT3 inactif est localisé dans le cytosol. Il a

été démontré que le STAT3 cytosolique pouvait réguler négativement l'autophagie en inhibant la réponse ISR par une interaction directe avec la kinase PKR (Shen et al., 2012) ou en séquestrant le facteur de transcription FOXO3 dans le cytosol (Oh et al., 2012). Le changement de localisation de STAT3 lors de son activation pourrait donc potentiellement induire des signaux d'activation de l'autophagie. Cependant, l'activation de la voie JAK/STAT canonique conduit à la phosphorylation de STAT3 sur des résidus tyrosine et à sa localisation nucléaire où il module positivement l'expression de Bcl-2, une protéine réprimant l'autophagie, ou négativement l'expression de différents gènes de l'autophagie comme Beclin1 (Miao et al., 2014) ou VPS34 (Yamada et al., 2012). Il apparaît donc que la régulation de l'autophagie par STAT3 est dépendante du contexte. Enfin, il a été démontré qu'une fraction du STAT3 cytoplasmique était phosphorylée sur le résidu sérine 727 et localisée à la membrane interne des mitochondries. Le STAT3 mitochondrial module l'activité de la chaîne de transport des électrons et limite la production de ROS (Szczepanek et al., 2012; Wegrzyn et al., 2009), réprimant ainsi l'induction de l'autophagie par le stress oxydant.

Il apparaît donc que la résolution des effets de STAT3 sur l'autophagie est dépendante de sa localisation mais aussi du contexte cellulaire comme l'activation de signaux de stress ou de cytokines ainsi que l'expression d'autres facteurs de transcription en fonction du type cellulaire.



**Figure 21 : Régulation différentielle de l'autophagie en fonction de la localisation de STAT3.**

Le STAT3 cytosolique non-phosphorylé séquestre et inhibe les protéines PKR ou FOXO3, toutes deux impliquées dans des voies activant la transcription de gènes de l'autophagie. Lorsque JAK est activé, STAT3 est phosphorylé sur des résidus tyrosine et transloqué dans le noyau où il induit l'expression de Bcl-2, un répresseur de l'autophagie, et inhibe directement la transcription de gènes de l'autophagie. Enfin, le STAT3 phosphorylé sur la sérine 727 est localisé à la mitochondrie où il réprime l'autophagie en limitant la production de ROS.

### *c. Régulation de l'autophagie par les MAPK :*

Une grande variété de signaux comme des cytokines ou un stress génotoxique ou oxydatif conduisent à l'activation de l'une ou plusieurs des trois principales voies des MAPK que sont les voies ERK1/2, p38 et JNK. Selon le contexte, ces voies répriment ou activent l'autophagie. En effet, elles peuvent d'une part activer le complexe mTORC1 et ainsi réprimer l'autophagie. D'autre part, leur activation conduit à leur translocation dans le noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription (e.g. c-Myc, c-Jun, c-Fos, ATF2, STAT3 ou CHOP) pour réguler positivement ou négativement l'expression de gènes dont certains de l'autophagie. Enfin, différents modes de régulation directe de l'autophagie par les voies de signalisation des MAPK ont été décrits.

JNK active l'autophagie en favorisant l'expression de la protéine DRAM (« damage-regulated autophagy modulator ») ou en dissociant l'interaction entre Bcl-2 et Beclin1 (Lorin et al., 2010; Wei et al., 2008). DRAM est une protéine localisée à la membrane des lysosomes connue pour réguler positivement l'autophagie, son mécanisme d'action n'a pas été identifié à ce jour.

Le rôle de p38 dans la régulation de l'autophagie est une fois de plus ambivalent et semble dépendre du contexte. En effet, suite à l'activation de la protéine de réponse à un stress génotoxique GADD45 (« Growth arrest and DNA damage 45 ») dans des fibroblastes murins, p38 est relocalisé à la membrane des autophagosomes où il pourra phosphoryler la protéine ATG5 pour l'inhiber et ainsi bloquer l'autophagie (Keil et al., 2013). A l'inverse, l'inhibition du protéasome dans des cellules épithéliales humaines stimule l'autophagie par un mécanisme qui dépend de l'activation de p38 (Choi et al., 2012). En effet dans ce contexte p38 inhibe la protéine GSK3 $\beta$  (« glycogen synthase kinase 3b »), ceci conduit à une inhibition de mTORC1 et une activation de l'autophagie en aval.

La voie ERK1/2 quant à elle réprime l'autophagie en phosphorylant le facteur de transcription pro-autophagique TFEB pour le séquestrer dans le cytosol et bloquer ses effets sur la transcription de gènes de l'autophagie (Settembre et al., 2011).

D'autres MAPK ont également été impliquées dans la régulation de l'autophagie. C'est par exemple le cas de la protéine ERK8 qui est localisée dans des compartiments autophagiques où elle interagit avec des protéines de la famille ATG8 pour stimuler l'autophagie en réponse à des carences en sérum ou en acides aminés (Colecchia et al., 2012).

Il apparaît donc que les voies des MAPK peuvent réguler l'autophagie positivement ou négativement à plusieurs niveaux. Les différentes MAPK sont impliquées dans la transduction de nombreux signaux extracellulaires. Ce contexte détermine alors l'impact que peuvent avoir ces voies de signalisation sur l'autophagie.

## E. Mécanismes cellulaires régulés par l'autophagie :

Comme évoqué précédemment, l'autophagie est un processus finement régulé par des voies de signalisation en réponse à de nombreux signaux comme les cytokines et facteurs de croissance, le statut métabolique ou divers stress intracellulaires. A son tour, elle participe à la régulation de nombreux mécanismes cellulaires dont les voies de signalisation, le métabolisme énergétique et l'inflammation.

### 1. Régulation des voies de signalisation par l'autophagie :

De nombreuses voies de signalisation régulant l'autophagie ont été identifiées. A l'inverse, quelques études suggèrent que l'autophagie pourrait être impliquée dans la régulation spatio-temporelle d'événements de signalisation.

#### *a. Régulation par la dégradation de protéines de signalisation :*

L'autophagie peut représenter un mécanisme de régulation dans le temps des voies de signalisation. De par son rôle dans la dégradation sélective de protéines, elle pourrait en effet participer à l'interruption de signaux. C'est ce qui a été démontré dans des cellules de carcinome squameux soumises à un stress induit par la déplétion de la kinase d'adhésion focale FAK. Dans ce contexte, les protéines à activité tyrosine kinase Src et Ret sont relocalisées à l'intérieur des autophagosomes pour être dégradées. La dégradation sélective par autophagie de ces deux protéines constitue un prérequis pour l'adaptation et la survie des cellules tumorales au stress induit par la déplétion de FAK. D'un point de vue mécanistique, le recrutement de la kinase Src à l'autophagosome est dépendant de la protéine CBL qui possède un motif LIR d'interaction avec LC3 (Sandilands et al., 2012a, 2012b). Dans le cadre des cancers, stimuler une autophagie qui dégrade des protéines impliquées dans des voies de signalisation oncogéniques pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante. Par exemple un traitement au bortezomib, un inhibiteur du protéasome, induit la dégradation par autophagie du récepteur à activité tyrosine kinase muté FLT3-ITD et donc à la mort des cellules de LAM qui expriment cette mutation (Larrue et al., 2016).

#### *b. L'autophagosome, une plateforme de signalisation :*

L'autophagosome pourrait également représenter une plateforme permettant d'initier et/ou maintenir des cascades de signalisation. Des expériences menées sur des fibroblastes embryonnaires de souris ont montré que l'activation de la voie des MAPK par le facteur de croissance épidermique (EGF) était dépendante des autophagosomes. En effet, l'EGF induit

la localisation de ERK1/2 et de la MAP2K qui l'active à la surface externe de la membrane des autophagosomes (Martinez-Lopez et al., 2013). Cette localisation favorise le rapprochement des acteurs moléculaires de la voie ERK, conférant à l'autophagosome un rôle de régulateur positif de l'initiation et du maintien de cascades de signalisation dépendantes de ERK.

En cancérologie, il a été montré que dans la LMC, un sous-type de NMP, que la signalisation oncogénique de la protéine de fusion BCR-ABL1 était dépendante, en partie, de sa localisation à l'autophagosome (Colecchia et al., 2015). Ici la protéine ERK8, un autre membre de la voie des MAPK, régule positivement l'autophagie en aval de BCR-ABL1 et permet la localisation de cet oncogène à l'autophagosome. Dans ce cas, inhiber la biogenèse des autophagosomes ou bloquer spécifiquement la localisation de protéines de signalisation à leur surface permettrait potentiellement de réprimer des voies de signalisation oncogéniques et représenterait une nouvelle stratégie thérapeutique dans les cancers.

### *c. L'autophagie dans la régulation de la signalisation de JAK2<sup>V617F</sup> :*

En condition physiologique, plusieurs travaux décrivent un rôle concomitant du protéasome et des lysosomes dans la dégradation des récepteurs EPO-R et MPL (Saur et al., 2010; Walrafen et al., 2005). Or, la présence de la mutation V617F de JAK2 entraîne une diminution de la maturation et du recyclage de MPL. Ceci s'accompagne d'une augmentation de la dégradation de ce récepteur essentiellement par le protéasome et d'une perturbation de sa localisation subcellulaire (Pecquet et al., 2012). De plus, une autre étude a montré que, dans des cellules qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>, MPL serait en partie localisé au niveau des autophagosomes (Cleyrat et al., 2014). Ainsi, étant donné que JAK2 sert de chaperonne dans la maturation et le trafic de son récepteur associé (Royer et al., 2005), nous pouvons émettre l'hypothèse que la tyrosine kinase mutée JAK2<sup>V617F</sup> pourrait également être localisée au niveau des autophagosomes. Il apparaît alors que l'autophagosome pourrait potentiellement contrôler la signalisation oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup>. Le processus d'autophagie représenterait donc une cible thérapeutique originale dans le traitement des NMP.

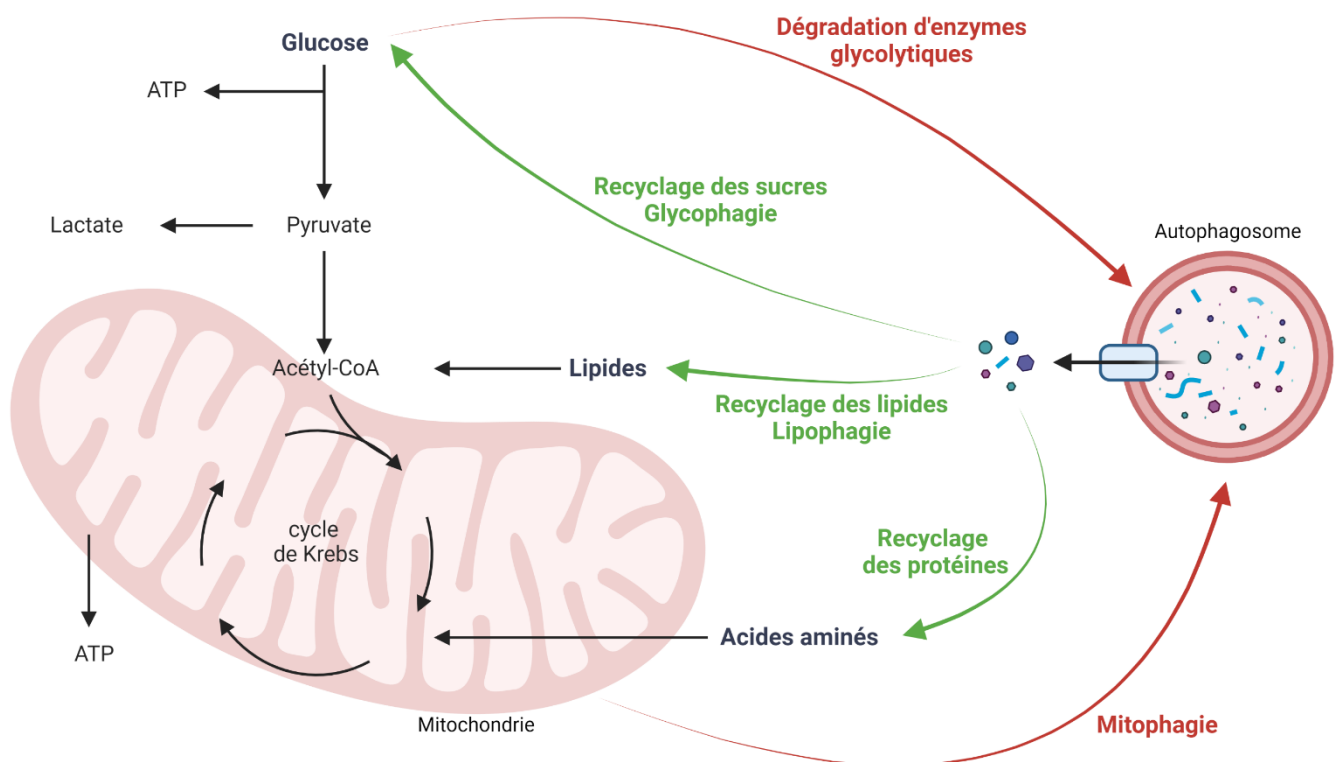
La protéine CBL, est présente dans le complexe de signalisation formé par JAK2 et son récepteur de cytokine associé et participe à l'ubiquitination et à la dégradation de ce même récepteur (Saur et al., 2010). De manière intéressante, la protéine CBL, est impliquée dans le recrutement de la kinase Src à l'autophagosome dans les cellules de carcinome squameux (Sandilands et al., 2012a). Cette protéine représenterait donc un candidat potentiel permettant la localisation de JAK2 à l'autophagosome.

## **2. Régulation du métabolisme énergétique par l'autophagie :**

De par son rôle dans la dégradation de protéines, d'organelles et d'autres composants cellulaires, l'autophagie produit différents substrats pour alimenter la glycolyse, la voie des

pentoses phosphates ou le cycle de Krebs (Galluzzi et al., 2014; Poillet-Perez et al., 2021; Rabinowitz and White, 2010). Il a par exemple été démontré que l'autophagie pouvait spécifiquement dégrader des gouttelettes lipidiques par un processus de lipophagie ou du glycogène pour produire respectivement des acides gras libres (Bosc et al., 2020; Singh et al., 2009) ou du glucose (Jiang et al., 2010) (Figure 22). De plus, la dégradation sélective des mitochondries par autophagie, appelée mitophagie, représente un acteur majeur dans la régulation de la masse et de l'activité des mitochondries (Lemasters, 2005). L'autophagie joue donc un rôle clé dans la régulation du métabolisme mitochondrial (Figure 22).

L'autophagie participe également à la dégradation de manière sélective d'enzymes clés du métabolisme énergétique. C'est par exemple le cas de l'hexokinase-2, une enzyme limitante de la glycolyse, qui a été identifiée comme étant sélectivement dégradée par autophagie dans des cellules de cancer du foie (Jiao et al., 2018). Ainsi, en régulant l'expression d'enzymes du métabolisme, ou leurs potentiels régulateurs en amont, l'autophagie peut contribuer à l'activation ou à l'inhibition de voies métaboliques de façon sélective (Figure 22).



**Figure 22 : Régulation du métabolisme énergétique par autophagie.**

L'autophagie participe aux apports en substrats nécessaires au fonctionnement du métabolisme énergétique. D'autre part, elle régule finement des voies métaboliques en dégradant sélectivement des enzymes du métabolisme ou via la mitophagie qui permet de contrôler la masse et l'activité des mitochondries.

Il apparaît que l'autophagie peut réguler finement tout un ensemble de voies métaboliques et donc permettre aux cellules d'adapter leur métabolisme énergétique en réponse à différents stimuli. Une des marques des cellules cancéreuses est leur capacité à reprogrammer leur

métabolisme énergétique pour s'adapter à leurs besoins accrus en composants de base et en substrats énergétiques tout en limitant leur stress oxydant. C'est aussi le cas des cellules de NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup> où la reprogrammation du métabolisme énergétique se caractérise par un effet Warburg et une dépendance accrue vis-à-vis du métabolisme des acides aminés (Rao et al., 2019; Zhan et al., 2015). Moduler l'autophagie dans des cellules de NMP permettrait donc potentiellement de cibler cette flexibilité métabolique et représenterait une stratégie thérapeutique intéressante dans ces hémopathies.

### 3. Régulation du stress oxydant par l'autophagie :

L'une des conséquences directes de l'activité des cellules et notamment du métabolisme mitochondrial est la production de ROS. À des concentrations faibles, les ROS sont essentiels au bon fonctionnement des cellules. Ils peuvent alors servir de seconds messagers et être impliqués dans diverses cascades de signalisation et ainsi réguler de nombreux processus biologiques comme la prolifération et la différenciation cellulaire ( pour revue : Holmström and Finkel, 2014). En revanche, lorsque le taux de ROS dépasse un certain seuil, l'apparition d'un état de stress oxydant peut-être délétère et causer la mort des cellules. Le stress oxydant peut également favoriser la mise en place d'une instabilité génomique ou l'activation de cascades de signalisation oncogéniques, ce qui conduit à la transformation tumorale des cellules. L'existence d'un équilibre du stress oxydant constitue donc un enjeu majeur pour les cellules. L'activation de l'autophagie en réponse à un stress oxydant est un processus largement documenté (pour revue : Redza-Dutordoir and Averill-Bates, 2021). En effet, la dégradation par autophagie de sources de ROS comme les mitochondries, les peroxysomes ou les agrégats protéiques permet de limiter le stress oxydant et représente un mécanisme d'adaptation et de survie cellulaire. Par ailleurs, il a récemment été rapporté que l'autophagie pouvait également limiter le taux de ROS en dégradant de manière sélective la protéine KEAP1 (« Kelch-like ECH-associated protein 1 »), une ubiquitine ligase responsable de la répression de l'expression de protéines antioxydantes (Chang et al., 2022).

La régulation du stress oxydant occupe une place centrale dans la biologie des cancers. En effet les niveaux de ROS sont sensiblement accrus dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales. Les ROS participent alors à des cascades de signalisation oncogéniques soutenant la prolifération, la survie cellulaire mais favorisant également la résistance thérapeutique (Moloney and Cotter, 2018). En effet, dans diverses hémopathies malignes l'expression d'oncogènes comme FLT3-ITD, JAK2<sup>V617F</sup> ou BCR-ABL1 induit une production accrue de ROS qui génèrent une instabilité génomique favorisant l'émergence de cellules résistantes aux thérapies anticancéreuses (Marty et al., 2013; Skorski, 2007; Stanicka et al., 2015). Cependant, de la même manière que dans des cellules saines, l'augmentation du stress oxydant jusqu'à un niveau trop élevé peut conduire à la mort des cellules tumorales. Ainsi, inhiber l'autophagie, qui joue un rôle prépondérant dans la défense des cellules face au



stress oxydant, pourrait représenter une stratégie thérapeutique intéressante dans les cancers. Par exemple, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules souches de LAM conduit à une élévation du niveau de ROS et à une perte des capacités de quiescence et d'auto-renouvellement de ces cellules (Pei et al., 2018). De la même manière, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules de LAM génère un stress oxydant élevé qui sensibilise les cellules à un traitement par un inhibiteur d'histone désacétylase (Torgersen et al., 2013). Ainsi, l'étude approfondie des liens entre autophagie et stress oxydant pourrait permettre de mieux définir si inhiber l'autophagie, afin d'accroître un stress oxydant délétère pour la cellule tumorale, représente une stratégie thérapeutique anticancéreuse prometteuse.

#### 4. Régulation de la mort cellulaire par l'autophagie :

L'autophagie et l'apoptose sont deux mécanismes étroitement liés. Selon le contexte, l'autophagie peut être associée à la mort des cellules ou bien contribuer à leur survie (Doherty and Baehrecke, 2018; Maiuri et al., 2007).

De par son rôle dans le maintien de l'homéostasie, l'autophagie représente un mécanisme général de survie cellulaire. Elle peut également participer de manière spécifique à l'inhibition de signaux de mort. La mitophagie peut également être importante pour inhiber des voies de mort cellulaire. En effet, la voie d'apoptose intrinsèque est caractérisée par une perméabilisation de la membrane externe des mitochondries responsable du relargage du cytochrome C et de l'initiation des signaux de mort. La dégradation de mitochondries perméabilisées par mitophagie permet aux cellules de supprimer ces signaux de mort et représente alors un mécanisme de survie (Rodriguez-Enriquez et al., 2006).

A l'inverse, plusieurs études décrivent également un rôle de l'autophagie dans la mort des cellules. Il a notamment été rapporté un mécanisme de mort cellulaire accompagné d'une forte accumulation de vésicules autophagiques (Schweichel and Merker, 1973). Cette voie de mort cellulaire dite de type II a tout d'abord été appelée mort cellulaire par autophagie. Mais l'implication de l'autophagie dans ce processus est encore soumise à débat. En revanche, elle a clairement été impliquée dans l'initiation d'autres mécanismes de mort cellulaire à travers la dégradation de facteurs anti-apoptotiques (Chen et al., 2018; Gump et al., 2014) ou anti-nécroptotiques (Yu et al., 2006, 2004). De même, la dégradation spécifique de la ferritine par autophagie, ou ferritinophagie, contribue à une élévation de la quantité de Fer libre dans les cellules et à la mort cellulaire par ferroptose (Hou et al., 2016). De la même manière que pour des voies de signalisation, l'autophagie peut également servir de plateforme pour le recrutement de protéines pro-apoptotiques comme la caspase-8 ou la protéine FADD (« Fas-associated protein with death domain ») et initier la formation de complexe de signalisation pro-apoptotiques (Young et al., 2012).

## 5. Régulation de l'inflammation par l'autophagie :

De nombreuses études établissent un rôle de l'autophagie dans l'inflammation ou elle peut être pro- ou anti-inflammatoire. (Matsuzawa-Ishimoto et al., 2018).

Dans l'inflammation, la fonction principale de l'autophagie est de réguler la production de cytokines en inhibant l'inflammasome, un complexe multiprotéique impliqué dans la maturation des cytokines actives (Ravindran et al., 2016; Saitoh et al., 2008; Shi et al., 2012). En ce sens, des défauts d'autophagie sont fréquemment associés à des maladies inflammatoires chroniques (Mizushima and Levine, 2020).

A l'inverse, l'autophagie exerce également des actions pro-inflammatoires. C'est par exemple le cas dans un modèle de cellules épithéliales transformées par l'expression de l'oncogène RAS où l'autophagie permet la sécrétion d'interleukine-6, une cytokine pro-inflammatoire qui a été impliquée dans ce modèle dans des processus d'invasion et de métastase (Lock et al., 2014).

Dans le cadre des NMP JAK2<sup>V617F</sup> et notamment dans la MFP, un phénotype d'inflammation chronique, caractérisé notamment par une élévation des taux circulants d'interleukine-6, a été impliqué dans le développement de la maladie et la survenue des symptômes chez les patients. Évaluer l'implication de l'autophagie dans ce phénotype inflammatoire pourrait permettre de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans ces hémopathies.

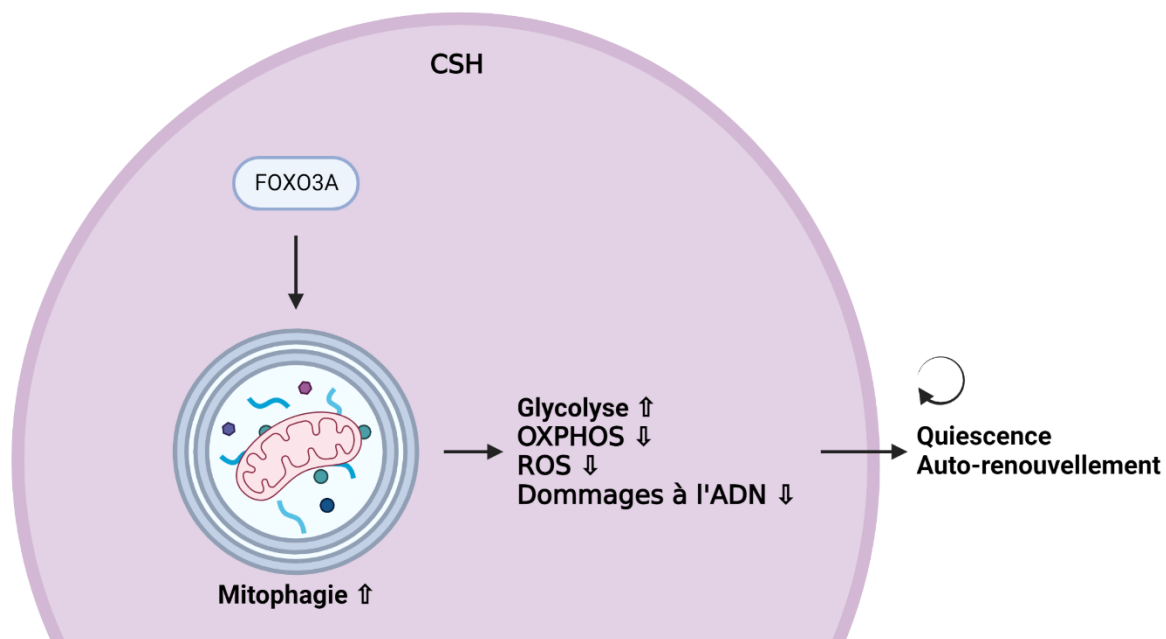
## F. Rôles de l'autophagie dans la myélopoïèse :

L'autophagie est un processus essentiel au bon fonctionnement de l'hématopoïèse tout au long de la vie de l'individu. Elle permet d'une part un maintien des CSH et participe d'autre part aux étapes tardives de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

### 1. Autophagie, CSH et vieillissement :

Plusieurs études ont montré que l'autophagie était impliquée dans le maintien de l'état souche et des fonctions des CSH. De par son rôle dans la dégradation et le recyclage des mitochondries, l'autophagie limite l'apparition de ROS et participe au maintien des CSH en quiescence (Figure 23). Dans ces cellules quiescentes, les niveaux d'autophagie sont élevés (Mortensen et al., 2011) et participent à l'élimination des mitochondries de manière sélective par un mécanisme de mitophagie dépendant des protéines PINK1/PARKIN (Ito et al., 2016). Une déplétion de l'autophagie dans les CSH entraîne une accumulation de mitochondries défectueuses, une élévation des ROS, des dommages à l'ADN et une entrée dans le cycle cellulaire. Ces effets se traduisent alors par une myélopoïèse exacerbée. D'un point de vue mécanistique, il a été montré dans un modèle murin que l'autophagie régulait le métabolisme

énergétique des CSH (Ho et al., 2017). En dégradant les mitochondries et donc en limitant la masse mitochondriale, l'autophagie réduit la phosphorylation oxydative, favorisant ainsi un métabolisme des CSH qui repose essentiellement sur la glycolyse. De manière similaire à une inhibition de l'autophagie, l'augmentation de l'activité des mitochondries est responsable de l'activation des CSH et donc de leur entrée en différenciation. Cette autophagie élevée protège les CSH en cas de stress et assure une certaine stabilité de l'hématopoïèse tout au long de la vie de l'individu. D'un point de vue mécanistique, cette autophagie élevée serait médiée par un programme transcriptionnel sous le contrôle du facteur FOXO3A (Warr et al., 2013). Cependant il a été démontré que l'autophagie décline au cours du vieillissement (Rubinsztein et al., 2011). Des défauts d'autophagie sont corrélés à un phénotype d'hématopoïèse « vieillissante » caractérisé par une activation accrue des CSH et une myélopoïèse exacerbée (Ho et al., 2017).



**Figure 23 : Rôle de l'autophagie dans le maintien des CSH.**

Les CSH présentent une autophagie élevée qui limite le métabolisme mitochondrial et prévient l'apparition de ROS et de dommages à l'ADN. Elle participe ainsi au maintien de l'état de quiescence et des capacités d'auto-renouvellement des CSH. (Abréviations : OXPHOS : phosphorylations oxydatives).

## 2. L'autophagie dans la différenciation myéloïde :

### a. L'autophagie dans l'érythropoïèse :

De manière intéressante, l'observation de l'accumulation d'autophagosomes dans des érythrocytes en cours de différenciation et de leur rôle potentiel dans les étapes tardives de l'érythropoïèse a été faite peu de temps après la découverte du processus d'autophagie (Kent et al., 1966). Au cours de la maturation des précurseurs érythroïdes, on observe une extrusion du noyau et de l'ensemble des organites pour aboutir aux érythrocytes matures. Cette étape

coïncide avec une stimulation de l'autophagie dépendante du facteur de transcription majeur dans l'érythropoïèse GATA1 (Kang et al., 2012). Ici encore, l'autophagie permet l'élimination programmée des mitochondries, une étape essentielle à la différenciation terminale des érythrocytes (Mortensen et al., 2010). La déplétion *in vivo* de l'autophagie spécifiquement dans le système hématopoïétique conduit à l'accumulation de mitochondries dans les érythrocytes immatures et à leur blocage en différenciation, ceci se traduit par une anémie sévère des souris.

#### *b. L'autophagie dans la granulopoïèse :*

En cas d'infection, la différenciation des granulocytes est accélérée pour permettre à l'organisme de lutter contre le pathogène. Au cours de ce processus, les cellules passent d'un métabolisme essentiellement glycolytique à un métabolisme oxydatif qui repose sur la mitochondrie pour produire son énergie. L'autophagie permet ce changement de métabolisme en dégradant des gouttelettes lipidiques par lipophagie (dégradation spécifique de lipides par autophagie). Ainsi, les acides gras libres générés par l'autophagie alimentent le cycle de Krebs et fournissent ainsi les besoins énergétiques nécessaires à la granulopoïèse (Riffelmacher et al., 2017).

#### *c. L'autophagie dans la mégacaryopoïèse :*

De manière similaire à l'érythropoïèse, la mégacaryopoïèse requiert l'action du facteur de transcription GATA1 qui active l'expression de plusieurs gènes de l'autophagie (Kang et al., 2012). Inhiber cette autophagie augmente le nombre de mitochondries et de ROS dans les mégacaryocytes et aboutit à la production de plaquettes défectueuses (Cao et al., 2015).

#### *d. L'autophagie dans la différenciation des macrophages :*

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans le processus de phagocytose et la production de cytokines. Outre son rôle dans la dégradation du matériel phagocyté, l'autophagie participe au contrôle de la différenciation de ces cellules (Jacquel et al., 2012; Obba et al., 2015). En effet, lorsque l'autophagie est bloquée dans ces cellules, les macrophages présentent des défauts de la phagocytose et une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (Stranks et al., 2015).

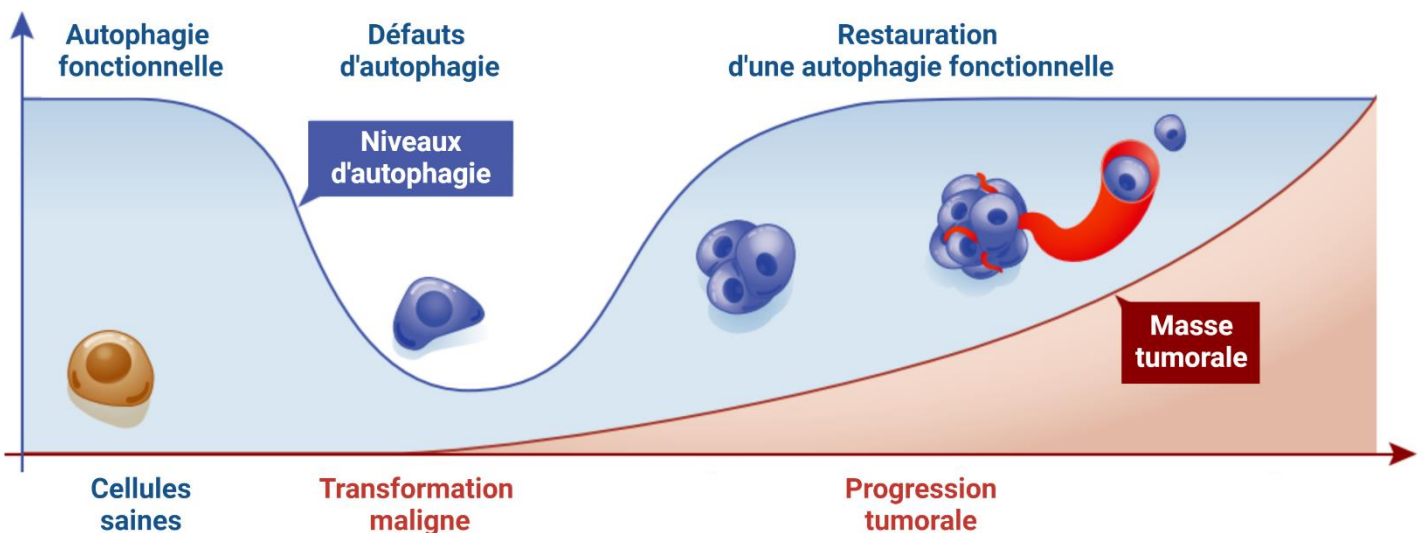
Par ailleurs, en fonction des stimuli, l'activation des macrophages passe par un processus de polarisation vers un phénotype « M1 » pro-inflammatoire et anti-tumoral ou « M2 » anti-inflammatoire. Lors de la polarisation, l'autophagie va dégrader les mitochondries et orienter les cellules vers un métabolisme glycolytique responsable de l'orientation vers un phénotype M1. A l'inverse, l'autophagie n'est pas impliquée dans la polarisation des macrophages M2 qui

présentent un métabolisme majoritairement oxydatif et donc dépendant des mitochondries (Esteban-Martínez et al., 2017).

Le rôle de l'autophagie apparaît donc central dans de nombreux processus physiologiques comme l'adaptation métabolique, la différenciation de certains types cellulaires, l'immunité, l'inflammation et le vieillissement. De par l'ensemble de ces rôles, il apparaît évident que l'autophagie est étroitement liée à de nombreuses maladies humaines comme les maladies métaboliques, neurodégénératives, inflammatoires ou auto-immunes mais aussi les cancers.

#### IV. L'autophagie, un processus largement étudié en cancérologie :

Au cours de ces dernières années, de nombreuses études ont établi un lien étroit entre autophagie et cancer où elle peut exercer un rôle pro- ou anti-tumoral (Galluzzi et al., 2015; Joffre et al., 2021, 2017). Ces informations contradictoires peuvent être réconciliées au regard du contexte dans lequel les études sont menées et du stade où l'on se situe dans les processus d'oncogenèse. En effet, de par son rôle clé dans la maintenance de l'homéostasie cellulaire, l'autophagie constitue un mécanisme de défense contre l'apparition de cancers. De plus, des défauts d'autophagie créent un contexte favorable à l'apparition de cancers. Mais dans les tumeurs établies, les cellules cancéreuses peuvent détourner l'autophagie à leur propre avantage pour favoriser leur développement (Figure 24).



**Figure 24 : Schéma général du rôle de l'autophagie dans la transformation et la progression tumorale.** L'autophagie protège les cellules saines de la transformation tumorale. À l'inverse, elle promeut la progression de tumeurs établies. Adapté de (Galluzzi et al., 2015).

## A. L'autophagie dans l'initiation et la progression des cancers :

### 1. Rôle suppresseur de tumeurs de l'autophagie :

Le rôle oncosuppresseur de l'autophagie a été identifié pour la première fois en 1999 avec la découverte du gène codant pour Beclin1, une protéine impliquée dans la biogenèse des autophagosomes, dans une région du chromosome 17 qui présente des délétions monoalléliques dans 40 à 75% des cancers sporadiques de l'ovaire, du sein et de la prostate (Aita et al., 1999). L'implication de délétions monoalléliques de gènes de l'autophagie dans les étapes précoces du développement tumoral a par la suite été confirmée dans des modèles murins. En effet, de nombreuses études ont démontré que la déplétion homozygote ou hétérozygote de gènes codant pour des protéines clés de l'autophagie comme Beclin1, ATG5 ou ATG7, développent spontanément plusieurs types de tumeurs (Liang et al., 1999; Mortensen et al., 2011; Takamura et al., 2011). De la même manière, la déplétion de l'autophagie accélère le développement de carcinomes pulmonaires générés par l'introduction de la mutation oncogénique KRAS<sup>G12D</sup> (Rao et al., 2014). Plusieurs mécanismes permettent d'expliquer ces observations. D'une part, en dégradant les mitochondries dysfonctionnelles ou les agrégats protéiques, l'autophagie limite le stress oxydant connu pour favoriser l'inflammation et l'apparition de dommages à l'ADN, deux mécanismes impliqués dans la tumorigenèse (Green et al., 2011).

D'autre part, l'autophagie participe au maintien des cellules souches normales en régulant l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation (Mortensen et al., 2011; Salemi et al., 2012). Le rôle de l'autophagie dans le maintien de l'état souche des cellules peut être attribué à sa capacité à réguler le métabolisme énergétique (Ho et al., 2017).

La présence d'oncogènes dans des cellules saines induit un important stress qui conduit normalement à l'activation de programmes oncosuppresseurs de mort cellulaire ou d'entrée en sénescence qui dépendent de l'autophagie (Elgendy et al., 2011; Young et al., 2009). L'autophagie pourrait dans certains cas dégrader des protéines oncogéniques comme p53 muté qui agit comme un dominant négatif pour réprimer la fonction de gardien du génome de p53 sauvage (Choundhury et al., 2013). C'est également le cas pour p62, une protéine normalement dégradée par autophagie. En effet, l'accumulation de p62 lorsque l'autophagie est inhibée conduit à l'activation de signaux oncogéniques et pro-inflammatoires (Mathew et al., 2009).

La dégradation sélective de pathogènes intracellulaires par autophagie, ou xénophagie, représente une ligne de défense des cellules contre les pathogènes carcinogènes (Sui et al., 2017). De plus, l'autophagie contribue à la veille immunitaire contre les cancers. En effet, il a été montré que l'autophagie était impliquée dans certaines conditions dans la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire (Michaud et al., 2011).

De la même manière que dans les autres cancers, l'autophagie est impliquée dans la limitation de l'apparition d'hémopathies malignes. Elle contribue au maintien des CSH et limite leur transformation leucémique (Mortensen et al., 2011). La déplétion de l'autophagie spécifiquement dans les cellules hématopoïétiques de souris augmente l'entrée en prolifération des CSH et conduit à l'apparition d'un phénotype pré-leucémique.

De nombreuses tumeurs sont caractérisés par l'activation constitutive de voies de signalisation oncogéniques qui conduisent à un accroissement de la prolifération des cellules indépendamment des facteurs de croissance et à une résistance aux signaux de mort. Ces signaux dérégulés conduisent généralement à une activation de la signalisation de mTORC1. L'activation de mTORC1 génère une pléthore d'effets oncogéniques et conduit à une inhibition de l'autophagie, cette inhibition pourrait notamment limiter les effets suppresseurs de tumeurs de l'autophagie et favoriser le développement du cancer (Murugan, 2019).

## 2. Rôle pro-tumoral de l'autophagie :

A l'inverse, la présence des oncogènes peut également conduire à l'activation de l'autophagie par divers mécanismes. Sous l'influence notamment d'oncogènes, les cellules cancéreuses peuvent détourner l'autophagie à leur propre avantage et favoriser leur prolifération. Dans les cancers plus avancés, les niveaux d'autophagie sont généralement élevés. Une étude menée sur 1400 tumeurs de 20 types de cancers différents a révélé qu'une autophagie accrue était corrélée à des tumeurs de plus haut grade, à une prolifération cellulaire et à une dissémination métastatique exacerbées ainsi qu'à un pronostic plus sombre pour les patients (Lazova et al., 2012). Par exemple, il a été montré dans des cellules de mélanome qu'une mutation activatrice de la sérine/thréonine kinase oncogénique BRAF conduisait à une activation chronique de signaux de stress du RE et à une activation de l'autophagie. Cette autophagie supportée par la présence de l'oncogène est nécessaire à la prolifération des cellules tumorales (Corazzari et al., 2015). De la même manière, des mutations activatrices des oncogènes RAS ou RAF induisent dans des cellules épithéliales de cancer du rein ou de poumon une autophagie basale élevée qui soutient la prolifération et la survie des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo* (Guo et al., 2011; Strohecker et al., 2013). Ces effets ont en partie été attribués au rôle de l'autophagie dans l'adaptation des cellules tumorales aux conditions environnementales extrêmes dans lesquelles elles se retrouvent (Degenhardt et al., 2006). En effet, la prolifération accrue des cellules tumorales crée une forte demande en nutriments. Cependant, les apports ne sont généralement pas suffisants et créent un stress métabolique au sein des tumeurs, l'autophagie alors stimulée permet aux cellules de s'adapter à ce stress et de proliférer. Il a été montré dans divers cancers que l'autophagie pouvait alimenter le métabolisme oxydatif en apportant des substrats énergétiques tel que la glutamine (Guo et al., 2011; Strohecker et al., 2013). De plus, l'autophagie permet la prolifération des cellules dans un environnement constamment exposé à un stress hypoxique.

Dans ce contexte, l'autophagie et plus particulièrement la mitophagie (Wu et al., 2014) pourrait participer à la reprogrammation du métabolisme énergétique induite par des niveaux faibles en oxygène (Eales et al., 2016).

Enfin, l'autophagie participe à l'échappement immunitaire des cancers (Duan et al., 2021). Afin d'être reconnues par le système immunitaire, les cellules cancéreuses présentent à leur surface des antigènes via les protéines du CMH de classe I (« complexe majeur d'histocompatibilité »). Cependant, dans des cellules de cancer du pancréas l'autophagie dégrade de manière sélective les protéines du CMH-I et contribue ainsi à l'échappement immunitaire de ces tumeurs (Yamamoto et al., 2020).

En ce sens, des stratégies visant à stimuler l'autophagie pour retarder le vieillissement et l'apparition de pathologies liées à l'âge comme les cancers font peu à peu leur apparition. C'est par exemple le cas de la restriction calorique, qui est définie comme une réduction des apports caloriques sans malnutrition ou de la spermidine, une molécule qui mime la restriction calorique. Ces approches stimulent l'autophagie et se sont déjà révélées efficaces pour limiter le vieillissement et l'apparition de cancers dans des modèles précliniques (López-Otín et al., 2016; Madeo et al., 2018; Pietrocola et al., 2016).

Dans les cancers hématologiques, certains oncogènes induisent également une autophagie pro-tumorale qui favorise la prolifération des cellules. C'est par exemple le cas dans les LAM exprimant les récepteurs tyrosine kinase mutés constitutivement activés FLT3-ITD et KIT<sup>D816V</sup>. Dans ces sous-types de LAM, l'expression de l'oncogène supporte un haut niveau basal d'autophagie par des mécanismes dépendants des facteurs de transcription ATF4 et STAT3 respectivement (Heydt et al., 2018; Larrue et al., 2019). De manière intéressante, dans la LMC l'expression de l'oncogène BCR-ABL1 induit également une augmentation de l'autophagie (Colecchia et al., 2015). Dans ce contexte, l'autophagie induite soutient la signalisation de l'oncogène, créant ainsi une boucle de rétrocontrôle positif qui soutient la prolifération cellulaire.

Il apparaît donc d'après l'ensemble de ces études qu'inhiber l'autophagie dans des tumeurs préexistantes représenterait une approche thérapeutique intéressante. Cependant, compte tenu du rôle central de l'autophagie dans de nombreux processus biologiques, cette stratégie pourrait s'avérer délétère pour l'hôte. L'existence d'une fenêtre thérapeutique a été confirmée dans des modèles murins de cancer du poumon. En effet, les conséquences d'une inhibition systémique de l'autophagie dans des souris atteintes de cancer du poumon sont premièrement observées sur les cellules tumorales avant d'engendrer des effets indésirables sur les tissus sains (Karsli-Uzunbas et al., 2014). Ceci supporte l'hypothèse selon laquelle l'inhibition de l'autophagie pourrait être bénéfique chez les patients atteints de cancer.

Comme dans les autres cancers, l'autophagie soutient la prolifération des LAM en participant à la régulation du métabolisme oxydatif. D'une part, en dégradant les gouttelettes lipidiques, elle fournit à la mitochondrie les acides gras libres nécessaires au fonctionnement du cycle de Krebs (Bosc, Broin et al., 2020). Un autre moyen pour l'autophagie de réguler le



métabolisme des LAM est de dégrader directement les mitochondries. Ce processus est notamment essentiel au maintien des cellules souches leucémiques initiatrices de la maladie (Li et al., 2021; Nguyen et al., 2019).

## **B. L'autophagie dans la réponse des hémopathies malignes aux traitements :**

Comme dans les autres cancers, de nombreux travaux mentionnent une induction de l'autophagie en réponse à divers traitements dans les hémopathies malignes. Cependant, selon le contexte, l'autophagie peut être soit cytotoxique, c'est-à-dire qu'elle contribue aux effets anti-cancéreux du traitement, soit cytoprotectrice, dans ce cas elle participe à la résistance des cellules au traitement (Joffre et al., 2021).

### **1. Traitements induisant une autophagie cytotoxique :**

Si l'autophagie induite par un traitement est cytotoxique, alors l'inhibition de celle-ci bloquera l'efficacité du traitement. Stimuler un tel processus d'autophagie avec différents traitements représenterait donc une approche thérapeutique intéressante dans les hémopathies malignes. Plusieurs mécanismes d'autophagie cytotoxique ont été décrits.

#### *a. Dégradation d'oncogènes en réponse au traitement :*

L'un des mécanismes d'autophagie cytotoxique est la dégradation d'oncoprotéines par autophagie en réponse au traitement. L'acide tout-trans rétinoïque (ATRA), un agent différenciant indiqué dans le traitement des leucémies aiguës promyélocyaires, induit dans ce sous-type de LAM un processus d'autophagie qui dégrade la protéine de fusion oncogénique PML-RAR $\alpha$  causant ainsi la mort des cellules tumorales (Isakson et al., 2010). C'est également le cas du bortezomib, un inhibiteur du protéasome. Ce traitement induit la localisation dans les autophagosomes et la dégradation spécifique de FLT3-ITD, conduisant à la mort des cellules de LAM qui expriment ce récepteur muté et dont elles sont dépendantes (Larrue et al., 2016).

Le trioxyde d'arsenic, un traitement initialement considéré comme un poison et retrouvé notamment dans la mort aux rats, a récemment gagné un grand intérêt dans le traitement des hémopathies malignes. Il cause la mort des cellules cancéreuses en induisant la dégradation par autophagie du récepteur muté FLT3-ITD dans les LAM (Liu et al., 2020), de PML-RAR $\alpha$  dans la leucémie aiguë promyélocytaire (Isakson et al., 2010) mais aussi de la protéine de fusion BCR-ABL1 dans la LMC (Goussetis et al., 2012). De manière intéressante, le trioxyde d'arsenic a récemment été identifié comme un traitement prometteur en combinaison avec

l'interféron alpha dans un modèle préclinique de NMP qui exprime JAK2<sup>V617F</sup> (Dagher et al., 2021), l'implication de l'autophagie dans ce contexte n'a pas été investiguée.

#### *b. Perturbations du métabolisme cellulaire en réponse au traitement :*

D'autres thérapies induisent une autophagie cytotoxique via la perturbation du métabolisme cellulaire. Dans les LAM, l'utilisation de doses élevées de quizartinib, un inhibiteur de FLT3-ITD, induit un processus de mitophagie létale causée par l'accumulation de céramides à la surface des mitochondries (Dany et al., 2016). Dans les cellules de LAM, le traitement par l'association de céramide et de tamoxifène induit également un processus de mitophagie impliqué dans la mort des cellules cancéreuses (Morad et al., 2019). Récemment, il a été montré que la dendrogénine A, un composé impliqué dans le métabolisme du cholestérol, induisait un processus d'autophagie léthale dans des cellules de LAM (Mouchel et al., 2020; Segala et al., 2017; Serhan et al., 2020).

#### **2. Traitements induisant une autophagie cytoprotectrice :**

De nombreux cas de traitements induisant une autophagie cytoprotectrice qui participent à la résistance des cellules sont également décrits. Dans ce contexte, l'ajout d'un inhibiteur de cette autophagie induite permettrait de sensibiliser les cellules cancéreuses au traitement de base. Des telles approches basées sur la combinaison d'un traitement préexistant en bithérapie avec un inhibiteur de l'autophagie sont évaluées dans les hémopathies malignes. Une première preuve de concept a été apportée dans la LMC où les inhibiteurs de BCR-ABL1 comme l'imatinib constituent la première ligne de traitement en clinique. En 2009, une première étude a montré que l'imatinib conduisait en partie à une mort par apoptose des cellules exprimant l'oncogène BCR-ABL1 mais également à un stress du RE qui induit une augmentation du processus d'autophagie. Cette autophagie induite contrecarre les effets du traitement. En effet, l'inhiber pharmacologiquement avec la chloroquine ou par interférence à l'ARN en ciblant ATG5 ou ATG7, améliore l'efficacité de l'imatinib (Bellodi et al., 2009).

Par la suite, l'autophagie a été impliquée dans la résistance aux traitements de divers cancers hématologiques dont les LAM. La chimiothérapie de base pour le traitement des patients atteints de LAM repose sur l'association d'une anthracycline avec la cytarabine. Dans un modèle murin de leucémie induite par l'expression de l'oncogène MLL-ENL, il a été démontré que la cytarabine induisait une autophagie cytoprotectrice dans les cellules souches initiateuses de la maladie. Inhiber cette autophagie par la déplétion de ATG7 augmente les effets cytotoxiques de la cytarabine *in vivo* (Sumitomo et al., 2016).

Une autophagie cytoprotectrice a également été identifiée dans d'autres traitements des LAM. Par exemple, dans un sous-type de leucémie myéloïde qui exprime la protéine de fusion

AML1-ETO, l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine sensibilise les cellules tumorales aux inhibiteurs d'histone désacétylases (Torgersen et al., 2013). De la même manière, un rôle cytoprotecteur de l'autophagie a été identifié suite à un traitement par l'azacitidine, un agent hypométylant utilisé en clinique, et le vénétoclax, un inhibiteur de Bcl-2 prometteur dans le traitement des LAM (Folkerts et al., 2019; Nawrocki et al., 2019).

Le rôle cytoprotecteur de l'autophagie dans la réponse au traitement des hémopathies malignes ne se limite pas aux cancers myéloïdes. En effet, dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules exprimant la protéine de fusion oncogénique NPM-ALK, l'inhibition de l'autophagie augmente les effets du crizotinib, un inhibiteur de ALK utilisé dans cette pathologie (Mitou et al., 2015).

### **C. L'autophagie dans la réponse au ruxolitinib des NMP exprimant JAK2<sup>V617F</sup> :**

Jusqu'à récemment, peu de données existaient quant au rôle de l'autophagie dans le traitement au ruxolitinib des NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>. Deux articles montrent que le ruxolitinib augmente l'autophagie dans une lignée cellulaire qui exprime JAK2<sup>V617F</sup> (Ishida et al., 2018; Machado-Neto et al., 2020). Dans ces deux travaux, inhiber l'autophagie augmente les effets cytotoxiques du ruxolitinib, suggérant donc un rôle cytoprotecteur de l'autophagie en réponse au traitement. Cependant, bien que le traitement au ruxolitinib ait été associé dans ces études à une répression de mTORC1 dans les cellules qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, ni les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette induction d'autophagie ni comment cette autophagie participe à la résistance au ruxolitinib ne sont pour le moment encore clairement établis. Par ailleurs, la pertinence d'une telle stratégie thérapeutique n'a pas été investiguée dans des cellules de patients ni dans des modèles précliniques *in vivo*.

En conclusion, l'autophagie est un processus étroitement lié avec la biologie des cancers où elle a notamment été impliquée dans les mécanismes de résistance aux traitements anticancéreux. Ce qui semble être le cas dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, même si des études complémentaires sont nécessaires. De plus, les mécanismes moléculaires reliant JAK2<sup>V617F</sup> et l'autophagie ne sont pas connus à ce jour. Or, une littérature grandissante attribue un rôle central dans la régulation du processus d'autophagie à la protéine phosphatase PP2A dont l'activité est réprimée par la signalisation oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup>. Cette phosphatase pourrait donc représenter un candidat potentiel dans la régulation de l'autophagie dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>.

## V. La protéine phosphatase PP2A, un régulateur potentiel de l'autophagie dans les NMP :

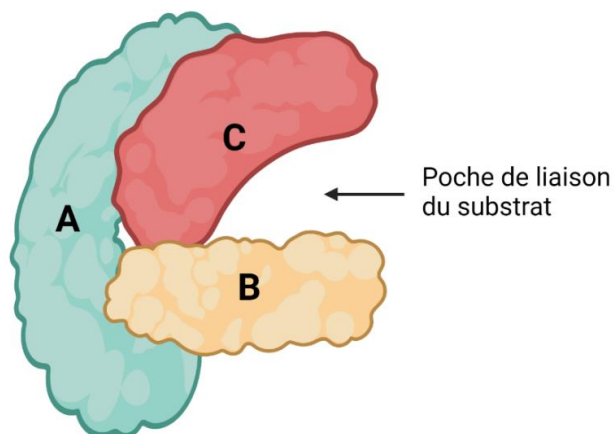
### A. Généralités sur PP2A :

#### 1. Généralités sur les phosphatases :

Comme toutes les modifications post-traductionnelles de protéines, les phosphorylations représentent un processus dynamique et réversible qui contrôlent une pléthore d'événements biologiques. Elles reposent sur l'action coordonnée de kinases et de phosphatases qui catalysent des réactions inverses d'ajout ou de retrait de groupements phosphate sur des résidus protéiques. Bien que l'immense complexité des kinases soit appréciée de longue date, la complexité des phosphatases a longtemps été sous-estimée puisqu'il était accepté qu'elles étaient actives à l'état basal et faiblement régulées. Cependant, les phosphatases sont des complexes multimériques d'une grande variété. La découverte de la diversité des combinaisons possibles au sein de ces complexes ainsi que des mécanismes pouvant les réguler a redonné un rôle central aux phosphatases dans le contrôle de processus biologiques hautement régulés. Parmi ces phosphatases, les sérine/thréonine protéines phosphatases 2A (PP2A) sont les plus étudiées (Virshup and Shenolikar, 2009). Ce sont des enzymes essentielles au bon fonctionnement des cellules. En effet, elles jouent un rôle critique dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, le cycle cellulaire, la survie et le contrôle du cytosquelette. De plus, la déplétion de PP2A est létale à l'état embryonnaire chez la souris (Götz et al., 1998).

#### 2. PP2A, une famille de phosphatases hétérotrimériques :

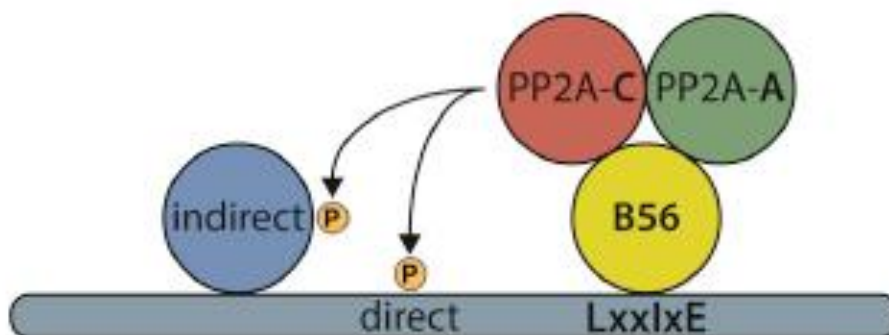
Le terme PP2A désigne une famille d'enzymes multimériques composées d'une sous-unité « A » structurale, d'une sous-unité « B » régulatrice et d'une sous-unité « C » catalytique (Figure 25). Les cellules eucaryotes contiennent une grande variété de phosphatases PP2A. Cette diversité est permise par l'existence d'un grand nombre de sous-unités B régulatrices. En effet, il en existe quatre familles : les sous-unités B55, les B56, les B'' et les B'''. Plusieurs gènes codent pour différents isoformes de sous-unités B au sein de chaque famille. De plus, chacun de ces gènes dispose d'un grand nombre de variants d'épissage, rendant possible la formation de plus de 200 combinaisons de sous-unités A, B et C. Ces sous-unités B confèrent à PP2A sa spécificité de substrat et régulent également sa localisation et son activité. Une fine régulation spatio-temporelle de la grande variété des complexes PP2A ainsi formés est essentielle au bon fonctionnement des cellules.



**Figure 25 : Composition des complexes hétérotrimériques PP2A.**

PP2A est composé d'une sous-unité A structurale, d'une sous-unité B régulatrice qui détermine la spécificité de substrat et régule son activité ainsi que d'une sous-unité C qui porte l'activité catalytique.

Les mécanismes moléculaires permettant la reconnaissance des substrats par PP2A sont peu documentés. Récemment, une étude a révélé l'existence d'un motif LxxIxE pouvant lier les sous-unités régulatrices B56 de PP2A qui permet la liaison de protéines substrats à PP2A (Hertz et al., 2016). Les protéines à domaine LxxIxE peuvent donc être directement reconnues par PP2A pour être déphosphorylées ou bien servir de partenaires pour la déphosphorylation de protéines d'un même complexe (Figure 26).



**Figure 26 : Mécanisme de reconnaissance des protéines à motif LxxIxE par PP2A.**

Les protéines à motif LxxIxE sont reconnues par la sous-unité B56 de PP2A et peuvent être directement déphosphorylées ou servir de support pour la déphosphorylation de protéines d'un même complexe. (Adapté de Hertz et al., 2016).

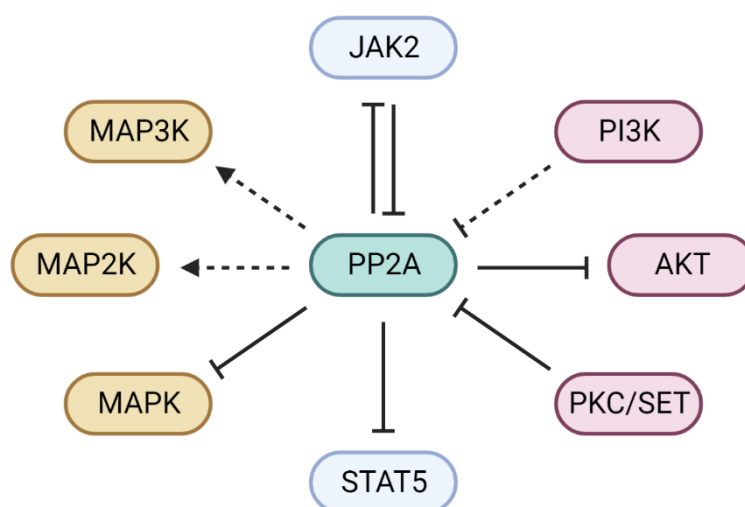
## B. Liens entre PP2A et la signalisation de JAK2 :

La régulation de PP2A par les voies de signalisation et son rôle dans le contrôle de celles-ci sont documentés de longue date. Des évidences claires démontrent en effet l'existence d'une boucle de régulation croisée entre PP2A et un ensemble de kinases, dont la signalisation de JAK2.

## 1. Régulation de PP2A par JAK2 :

Plusieurs modifications post-traductionnelles des sous-unités de PP2A ont été décrites. Premièrement, la sous-unité C de PP2A peut être inhibée par phosphorylation sur sa tyrosine en position 307. Il a été montré que cette phosphorylation pouvait être médiée par des récepteurs à activité tyrosine kinase mais aussi par JAK2. C'est le cas dans une lignée cellulaire de progéniteurs granulocytaires, dans lesquelles l'interleukine-3 en activant JAK2 promeut l'interaction de la sous-unité C de PP2A avec JAK2 (Yokoyama et al., 2001). Cette déphosphorylation aboutit alors à une inhibition transitoire de l'activité de PP2A (Figure 27).

Plusieurs protéines, comme SET/I2PP2A (« inhibitor 2 of PP2A ») et CIP2A (« cancerous inhibitor of PP2A »), jouent un rôle d'inhibiteur endogène de PP2A. SET interagit avec la sous-unité catalytique de PP2A pour l'inhiber alors que CIP2A lie et séquestre des sous-unités régulatrices de type B56. Il a été démontré que la kinase PKC, activée en aval de JAK2, pouvait directement phosphoryler SET pour activer sa liaison à PP2A (Oaks et al., 2013). Par ailleurs, l'expression de PP2A semble régulée par la voie PI3K, située en aval de JAK2, par un mécanisme faisant intervenir le micro-ARN MiR-375 (Bartalucci et al., 2017).



**Figure 27 : Régulation croisée de la signalisation dépendante de JAK2 et la phosphatase PP2A.**

JAK2 interagit avec PP2A pour l'inhiber. La voie de signalisation PI3K/PKC/SET, activée en aval de JAK2, réprime également l'activité de PP2A. À l'inverse, l'implication de PP2A dans la signalisation de JAK2 a été documentée à plusieurs niveaux. Cette phosphatase exerce globalement un contrôle négatif de ces voies de signalisation mais est également impliquée dans les événements précoces d'activation de la voie des MAPK.

## 2. Régulation de la signalisation de JAK2 par PP2A :

Une régulation croisée de PP2A sur la signalisation de JAK2 est également documentée. En effet, PP2A déphosphoryle et inhibe les trois principales voies activées en aval de JAK2

que sont les voies PI3K/AKT, MAPK et STAT (Figure 27). Premièrement, il a été montré que PP2A inhibe AKT en déphosphorylant son résidu thréonine 308 (Kim et al., 2009). De la même manière, PP2A régule négativement la voie des MAPK en déphosphorylant directement la kinase ERK (Anderson et al., 1990). Ces observations sont confirmées dans ces deux études par le fait que l'acide okadaïque, un inhibiteur pharmacologique de PP2A, stimule la phosphorylation de AKT et de ERK. Cependant, les événements précoces d'activation de la voie des MAPK sont par ailleurs régulés positivement par PP2A. En effet en amont de ERK, l'activité phosphatase de PP2A est nécessaire à l'activation des MAP3K (Jaumot and Hancock, 2001) et MAP2K (Ory et al., 2003). Enfin, l'association de PP2A et STAT5 a également été décrite dans une lignée cellulaire de progéniteurs myéloïdes (Yokoyama et al., 2001) en réponse à l'activation de JAK2 par l'interleukine-3. La phosphorylation de STAT5 sur des résidus sérine a été décrite, elle est impliquée dans l'amplification de l'activation de ce facteur de transcription et semble dépendante de la PI3K (Bartalucci et al., 2017). Il apparaît donc que PP2A serait impliqué dans la limitation du signal de STAT5. En effet, inhiber PP2A augmente l'amplitude du signal de STAT5. Cependant, inhiber PP2A augmente aussi la phosphorylation de STAT5 sur des résidus tyrosine, suggérant donc un rôle de cette phosphatase dans la régulation directe du complexe en amont formé par JAK2 et le récepteur de cytokine. Une phosphorylation inhibitrice de JAK2 sur le résidu sérine 523 a en effet déjà été renseignée dans des fibroblastes murins où elle a été impliquée dans une boucle de rétrocontrôle négatif médiée par la voie des MAPK (Mazurkiewicz-Munoz et al., 2006).

A travers l'ensemble de ces régulations, nous pouvons établir un modèle théorique selon lequel l'action antagoniste de JAK2 et PP2A permet la régulation fine d'un ensemble de voies de signalisation. Lorsque JAK2 est activé, il phosphoryle ses cibles en aval, cette stimulation semble être permise par une inhibition concomitante de PP2A par JAK2. En revanche, cette inhibition est transitoire (Yokoyama et al., 2001) et la réactivation de PP2A permettrait alors de réguler l'amplitude et la durée des signaux amorcés par l'activation de JAK2.

## **C. Régulation de l'autophagie par PP2A :**

### **1. Régulation des voies de signalisation qui contrôlent l'autophagie par PP2A :**

Des travaux menés dans les années 1990 ont montré que l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque abrogeait totalement l'autophagie induite par une carence en nutriments dans des hépatocytes de rats (Holen et al., 1993). Ces travaux avaient alors permis de conclure à juste raison que l'autophagie était un processus régulé par des kinases. Ils ont également mis en évidence l'implication de phosphatases dans la régulation de l'autophagie. Comme décrit précédemment, l'activité phosphatase de PP2A est étroitement liée à la régulation de diverses

cascades de signalisation. Il n'est donc pas étonnant qu'à travers son rôle dans la régulation des voies PI3K/AKT, JAK/STAT ou des MAPK, PP2A puisse réguler l'autophagie à son tour (Figure 28). Plusieurs régulateurs de l'autophagie sont des cibles décrites de PP2A :

#### *a. Régulation du facteur de transcription TFEB par PP2A :*

TFEB régule l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la biogenèse des lysosomes et l'autophagie (e.g. Beclin1, ATG8, p62, ATG5). En condition basale, mTORC1 phosphoryle TFEB pour le séquestrer dans le cytosol et inhiber ses fonctions. Il a cependant été montré dans divers modèles que TFEB pouvait être activé indépendamment du statut de mTORC1. Dans des cellules épithéliales de rétine, en condition d'induction d'un stress oxydant par un traitement à l'arsénite, TFEB est activement déphosphorylé par PP2A et peut être transloqué dans le noyau pour réguler l'expression de gènes de l'autophagie (Martina and Puertollano, 2018). De manière intéressante, l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque reverse ce processus. A l'inverse, un traitement au FTY720, qui force l'activation de PP2A en inhibant son interaction avec la protéine SET, est suffisant pour reproduire une activation de TFEB. De la même manière, la perturbation du trafic vésiculaire par un inhibiteur de la phosphoinositide 5-kinase déplace l'interaction entre TFEB et mTORC1 et active PP2A qui pourra alors déphosphoryler TFEB pour l'activer (Hasegawa et al., 2022). Ces deux travaux décrivent donc une régulation positive de PP2A sur l'autophagie (Figure 28).

#### *b. Régulation de la kinase AMPK par PP2A :*

AMPK est un régulateur majeur de l'autophagie en condition de stress énergétique, elle régule positivement l'autophagie en phosphorylant des protéines ATG dont notamment UKL1. Plusieurs études ont montré que moduler pharmacologiquement l'activité de PP2A pouvait impacter l'autophagie par un mécanisme dépendant de AMPK. Par exemple le lomitapide, un inhibiteur du transport des lipides à la membrane interne de la mitochondrie, interagit directement avec PP2A ce qui a pour effet de bloquer la déphosphorylation de AMPK par cette phosphatase et ainsi induire l'autophagie (Zuo et al., 2021). Ces travaux montrent que PP2A peut réguler négativement l'autophagie en inhibant AMPK (Figure 28).

## **2. Régulation directe de protéines ATG par PP2A :**

Plusieurs protéines ATG sont régulées par des phosphorylations sur des résidus spécifiques. Il n'est donc pas étonnant que PP2A puisse être également impliqué dans le contrôle de l'activité de ces protéines ATG.



#### *a. Régulation de ULK1 par PP2A :*

ULK1 est une kinase centrale dans le complexe d'initiation responsable de la biogenèse des autophagosomes. Elle est notamment régulée négativement par mTORC1 qui inhibe son activité par des phosphorylations sur les résidus sérine 757 et 637/638. L'exposition des cellules à une carence en nutriments aboutit à une levée de l'inhibition de ULK1 et à une induction de l'autophagie. Il a été montré que la carence induisait une déphosphorylation spécifique de ULK1 sur la sérine 637 par le complexe PP2A comprenant une sous-unité B55 $\alpha$  (Wong et al., 2015). La régulation concomitante de ULK1 par mTORC1 et PP2A sert donc d'interrupteur de signalisation pour activer ou inhiber l'autophagie en condition de carence en nutriments (Figure 28).

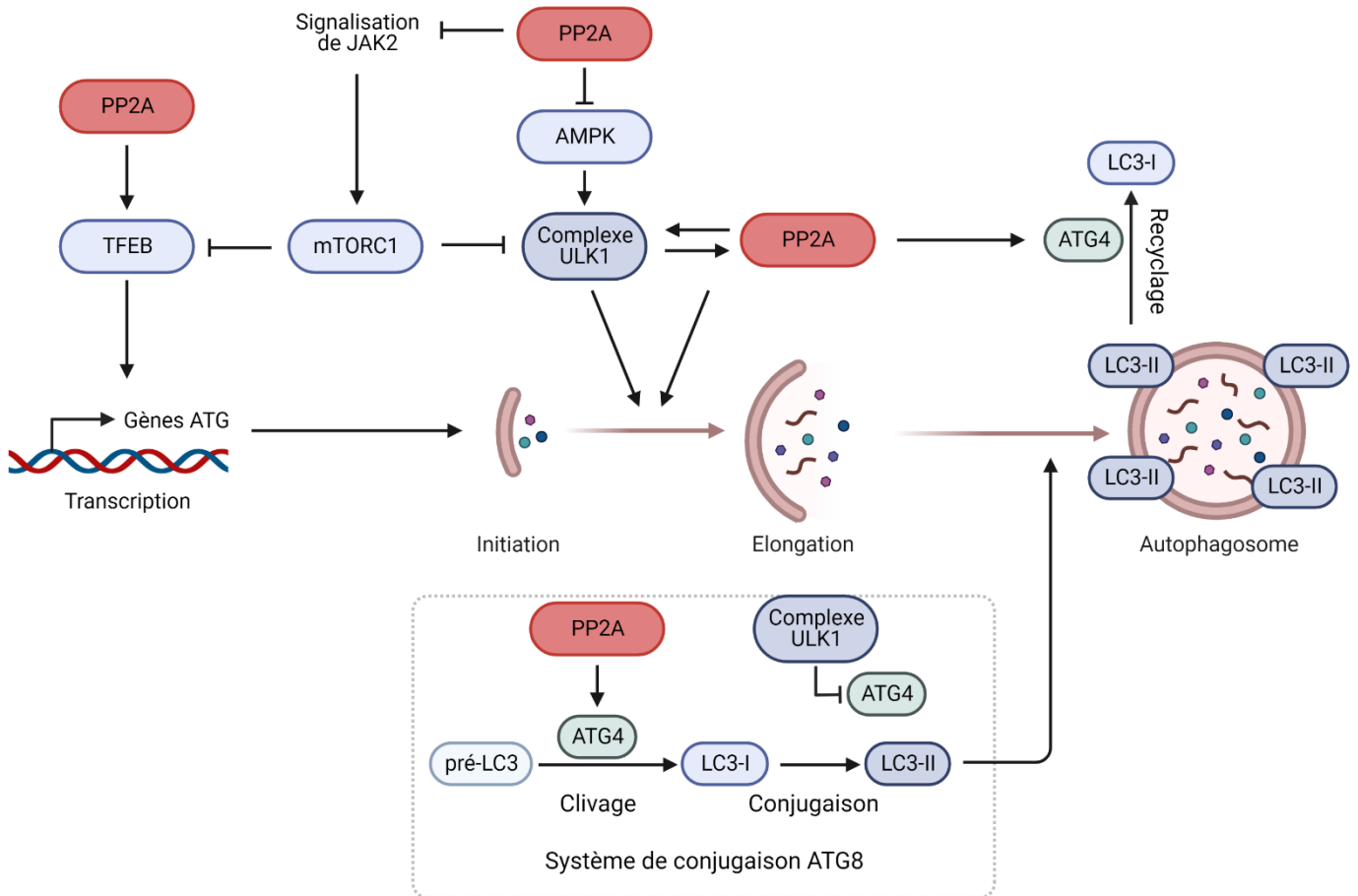
Récemment, l'interactome de ULK1 a été déterminé par une approche de phosphoprotéomique menée en parallèle dans deux lignées cellulaires en condition d'induction d'autophagie dépendante de ULK1 par la rapamycine ou par une carence en nutriments (Hu et al., 2021). Ainsi, un ensemble de 157 protéines a été identifié comme directement régulé par ULK1 dont de nombreuses protéines connues de l'autophagie. Dans cette étude, les chercheurs ont observé que l'induction de l'autophagie était corrélée avec une augmentation globale de l'activité de phosphatases dans la cellule. Comme décrit précédemment, il a été retrouvé que PP2A déphosphoryle ULK1 pour activer l'autophagie. Mais de manière intéressante, plusieurs sous-unités de PP2A dont des sous-unités B régulatrices ont été retrouvées parmi les cibles de ULK1, liant donc ULK1 et PP2A dans une boucle de rétrocontrôle positif (Figure 28). Cette activation finement régulée d'un réseau de phosphatases par ULK1 semble nécessaire au bon fonctionnement de l'autophagie, PP2A apparaît donc également essentielle à la signalisation pro-autophagique en aval de ULK1. Plusieurs complexes PP2A peuvent intervenir dans la régulation de l'autophagie, cette étude suggère que ULK1 pourrait affecter l'architecture des complexes PP2A et donc orchestrer son activité phosphatase en modifiant sa spécificité de substrat ou sa localisation. En retour, PP2A peut également déphosphoryler ULK1 pour activer l'autophagie.

#### *b. Régulation de ATG4B par PP2A :*

ATG4B est une cystéine protéase impliquée dans la maturation et le recyclage de LC3. Elle est finement régulée tout au long du processus d'autophagie. En effet, son activation est nécessaire à la maturation du pré-LC3 en LC3-I. Par la suite, elle doit être réprimée pour permettre au LC3-I d'être incorporé dans les autophagosomes naissants sous sa forme LC3-II. Enfin, à la fin du processus d'autophagie, la réactivation de ATG4B permet le recyclage de LC3-II en LC3-I. Une étude a révélé que cette activité de ATG4B était régulée par un mécanisme intermittent de phosphorylation (Pengo et al., 2017). En effet, ATG4B est phosphorylé par ULK1 sur la sérine 316 pour être réprimé alors que PP2A déphosphoryle

ATG4B sur ce même résidu pour l'activer (Figure 28). L'action séquentielle de PP2A et ULK1 apparaît nécessaire à la régulation de ATG4B et pourrait permettre son activation ou son inhibition en fonction de la localisation dans le processus d'autophagie. Ainsi, l'activité protéase de ATG4B est nécessaire au clivage du pré-LC3 en LC3-I dans le cytosol. Lors du processus d'initiation de l'autophagie, ULK1 phosphoryle et réprime ATG4B pour permettre l'ancrage du LC3-II à la membrane des autophagosomes naissants. Par la suite, l'action de PP2A apparaît nécessaire à la déphosphorylation de ATG4B pour permettre sa réactivation et ainsi favoriser le recyclage du LC3-II en LC3-I à la membrane des autophagosomes formés en cours de maturation.

Au regard de l'étude protéomique précédemment décrite (Hu et al., 2021), ce mécanisme de régulation de ATG4B est un bon exemple du rôle des phosphatases dans la régulation spatio-temporelle des protéines ATG au cours du processus d'autophagie.



**Figure 28 : Rôle central de PP2A dans la régulation de l'autophagie.**

PP2A est impliqué à plusieurs niveaux dans la régulation de l'autophagie. Cette phosphatase participe à la transcription de gènes de l'autophagie via la protéine TFEB. Elle régule également la signalisation en amont du complexe d'initiation de l'autophagie ULK1. Enfin, elle est étroitement impliquée dans le contrôle spatio-temporel de l'activité de protéines ATG (e.g. ATG4) en aval de ULK1 pour assurer le bon déroulement du processus d'autophagie.

## D. Rôle de PP2A dans l'érythropoïèse :

Dans l'hématopoïèse fœtale, PP2A est nécessaire à la maturation finale des érythrocytes. En effet, la déplétion de sa sous-unité catalytique dans le système hématopoïétique bloque l'érythropoïèse terminale et conduit à une production réduite de globules rouges (Chen et al., 2011). Ces effets ont été attribués à un rôle potentiel de PP2A dans la survie des progéniteurs érythroïdes engagés. Au regard du rôle de PP2A dans la signalisation de JAK2, une éventuelle perturbation de cette signalisation par l'inhibition de PP2A pourrait également expliquer ce phénotype. Etant donné que PP2A est un régulateur de l'autophagie, une autre hypothèse également envisageable serait que PP2A soit impliquée dans l'induction de l'autophagie nécessaire aux étapes terminales de différenciation érythroïde (Mortensen et al., 2010).

## E. Liens entre PP2A et cancers :

### 1. Rôle suppresseur de tumeurs de PP2A :

Le rôle suppresseur de tumeurs de PP2A est connu de longue date. En effet, son inhibition *in vivo* par l'acide okadaïque active des voies oncogéniques et promeut d'une manière dose-dépendante le développement de cancers suite à une lésion (Fujiki and Suganuma, 1993). Il était aussi connu que des protéines virales transformantes pouvaient induire le processus de tumorigenèse par un mécanisme qui dépendait d'une inhibition de PP2A. C'est par exemple le cas de l'antigène « petit t » de SV40 qui forme des complexes avec des sous-unités A et C de PP2A pour bloquer le recrutement de la sous-unité B et ainsi inhiber l'activité phosphatase de PP2A (Pallas et al., 1990). Par ailleurs, le rôle précédemment discuté de PP2A dans la régulation de voies de signalisation oncogéniques suggère un mécanisme suppresseur de tumeur médié par cette phosphatase. La protéine oncogénique Myc est également régulée par PP2A qui peut déphosphoryler Myc en sérine 62 pour induire sa dégradation. Inhiber PP2A stabilise cMyc et active sa signalisation oncogénique, conduisant à la transformation tumorale de cultures cellulaires de fibroblastes humains *in vitro* (Yeh et al., 2004). Il apparaît donc que PP2A exerce un rôle suppresseur de tumeurs et que des dérégulations de son activité favorise des processus oncogéniques. Cette notion a été confortée par la découverte de mutations affectant PP2A dans 15% des cancers du poumon et du colon. De plus, des délétions monoalléliques de PP2A sont retrouvées dans 30 à 50% des cancers du poumon, du sein, des ovaires et du col de l'utérus (Wang et al., 1998). C'est également le cas dans les hémopathies malignes comme les LAM où l'expression de la sous-unité B55 $\alpha$  est inhibée dans de larges cohortes d'échantillons de patients (Ruvolo et al., 2011). Enfin, les protéines SET et CIP2A sont très fréquemment surexprimées dans divers cancers dont les LAM et la LMC où leur expression est corrélée à un mauvais pronostic (Cristóbal et al., 2010; Lucas et al., 2011;

Neviani et al., 2005). Sur la base de ces données, des stratégies thérapeutiques visant à augmenter l'activité de PP2A (PAD, « PP2A activating drugs ») ont été développées.

La preuve de concept a été apportée une fois de plus dans la LMC où l'inhibition de PP2A semble jouer un rôle prépondérant au cours de l'oncogenèse. Dans cette pathologie, la présence de l'oncogène BCR-ABL1 augmente les niveaux d'expression de la protéine SET, un inhibiteur endogène de PP2A. Dans ces cellules, un traitement par un PAD, tout comme la déplétion de SET ou la surexpression de PP2A, réduit drastiquement la signalisation de BCR-ABL1 et induit sa dégradation (Neviani et al., 2007, 2005).

## 2. Rôle pro-tumoral de PP2A :

Cependant le rôle suppresseur de tumeur *stricto sensu* de PP2A est encore discuté. En effet, l'inhibition de PP2A n'est pas seulement associée à des processus d'oncogenèse mais aussi à de la mort cellulaire. En raison du rôle prépondérant de cette phosphatase dans la régulation de nombreux processus cellulaires clés, l'utilisation d'inhibiteurs de PP2A pourrait également présenter un intérêt en cancérologie. En effet, il a été montré que l'inhibition de PP2A induisait un arrêt des cellules dans le cycle cellulaire et bloquait les mécanismes de réponse aux dommages à l'ADN (Lu et al., 2009). Ainsi, le LB-100, un inhibiteur de la sous-unité C de PP2A, a été testé dans divers cancers solides de haut grade lors d'un essai clinique de phase I. Les résultats ont révélé une bonne tolérabilité et ont apporté quelques évidences préliminaires de l'activité anti-tumorale du LB-100 (Chung et al., 2017). Aujourd'hui, le LB-100 est évalué en clinique dans des essais de phase I/II dans des stades avancés de cancer du poumon (essai clinique NCT04560972) ou de glioblastome (essai clinique NCT03027388) en combinaison ou non avec d'autres thérapies.

En conclusion, PP2A est une phosphatase finement régulée qui est impliquée dans de nombreux processus biologiques. Pour cela, inhiber ou activer PP2A impacte le devenir des cellules et ces deux stratégies pourraient potentiellement être d'intérêt dans les cancers en fonction du contexte. Cependant, PP2A exerce également des fonctions oncosuppressives, les stratégies visant à inhiber PP2A doivent donc être optimisées. Un moyen de cibler spécifiquement un ou plusieurs processus clés serait de cibler les sous-unités B régulatrices pour cibler des complexes PP2A précis.

## 3. La phosphatase PP2A dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup> :

Plusieurs études se sont intéressées à PP2A dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>. Premièrement, de manière similaire à la LMC, il a été démontré que l'expression de JAK2<sup>V617F</sup> réprime PP2A par un mécanisme dépendant de l'activation de la protéine SET en aval de la

voie PI3K/PKC. L'activation de PP2A par un traitement au FTY720 exerce un fort effet cytotoxique *in vitro* et *in vivo* dans les cellules qui expriment JAK2<sup>V617F</sup> (Oaks et al., 2013).

Une autre étude datant de 2016 a décrit les effets de la metformine, un inhibiteur du complexe I de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie. La metformine bloque la prolifération et induit la mort des cellules de NMP JAK2<sup>V617F</sup> par un mécanisme qui dépend de l'interruption de la signalisation de JAK2 par PP2A (Kawashima and Kirito, 2016). Ce traitement à la metformine exerce une cytotoxicité forte en monothérapie et augmente également les effets du ruxolitinib *in vitro*. De manière surprenante, l'inhibition de PP2A par l'acide okadaïque ou son activation par le FTY720 conduisent à une même inhibition de la signalisation de JAK2. D'un point de vue mécanistique, il a été montré dans cette étude que différents complexes de PP2A étaient affectés par les traitements, ceci pouvant expliquer les effets similaires obtenus avec deux drogues à l'activité opposée. En effet, en réalisant un criblage des sous-unité B de PP2A, les auteurs ont montré que l'activation de PP2A par le FTY720 ciblait des complexes PP2A comprenant une sous-unité B56 $\alpha$  et que cette sous-unité était impliquée dans l'inhibition de JAK2<sup>V617F</sup>. De la même façon, les complexes PP2A à sous-unité B56 $\gamma$  activent JAK2<sup>V617F</sup> et inhibent AMPK dans ces cellules, ces complexes seraient préférentiellement ciblés par l'acide okadaïque.

Enfin, une dernière étude publiée en 2017 a montré que les niveaux de CIP2A étaient élevés dans des lignées cellulaires et des cellules de patients atteints de NMP. Lorsque JAK2<sup>V617F</sup> est inhibé par le ruxolitinib, l'inhibition de STAT5 n'est pas totale en raison de la persistance de phosphorylations de STAT5 par PI3K/mTORC1 sur des résidus sérine. Inhiber PI3K ou mTORC1 conduit à une réduction de l'expression de CIP2A et à une déphosphorylation de STAT5 sur ces résidus sérine par un mécanisme dépendant de l'activité de PP2A (Bartalucci et al., 2017).

D'après l'ensemble de ces résultats, il apparaît que l'expression de JAK2<sup>V617F</sup> réprime PP2A dans les cellules de NMP et que cette répression est au moins en partie responsable du maintien de la signalisation oncogénique de JAK2. De plus, cette phosphatase pourrait potentiellement être impliquée dans le contrôle du processus d'autophagie en aval de JAK2<sup>V617F</sup>.

# **HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS**

## I. HYPOTHÈSE :

L'autophagie est un processus catabolique de recyclage essentiel au maintien de l'homéostasie cellulaire. C'est un mécanisme finement régulé au niveau transcriptionnel mais également au niveau post-traductionnel par un ensemble de kinases et de phosphatases permettant ainsi aux cellules de résister à un large panel de stress. L'autophagie peut donc être définie comme un processus d'adaptation et de survie cellulaire. Elle a été impliquée dans de nombreux processus biologiques comme le métabolisme, l'apoptose, l'inflammation, l'immunité, l'instabilité génétique ou la différenciation. Cependant dans de nombreux cancers, les cellules tumorales détournent l'autophagie à leur propre avantage pour proliférer et survivre dans des conditions environnementales extrêmes et même résister aux traitements anti cancéreux.

Dans les NMP, l'identification de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> a permis une meilleure compréhension physiopathologique de la maladie. Cette découverte a conduit au développement d'inhibiteurs de JAK comme le ruxolitinib aujourd'hui approuvé dans le traitement des NMP. Cependant, les bénéfices du ruxolitinib se sont avérés limités avec notamment des réponses partielles ou non durables chez les patients. Ceci suggère la mise en place de mécanismes de résistance qui permettent aux cellules cancéreuses de s'adapter au traitement et de survivre. L'essentiel des études menées jusqu'à présent sur la résistance au ruxolitinib a porté sur la réactivation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la survie suite à une exposition prolongée au traitement. Cependant, compte tenu du faible nombre d'alternatives thérapeutiques pouvant être proposées aux patients atteints de NMP réfractaires au ruxolitinib, il apparaît nécessaire d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance afin de développer des stratégies thérapeutiques innovantes et ainsi d'améliorer la prise en charge des patients. L'autophagie représente un candidat intéressant étant donné son importance dans les mécanismes d'adaptation cellulaire et notamment dans la réponse aux traitements dans divers cancers. Cependant, les données de la littérature quant à un potentiel rôle de l'autophagie dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup> en réponse au ruxolitinib sont à ce jour incomplètes.

Une autre cause fréquente d'échec du ruxolitinib en clinique est l'interruption du traitement en raison d'effets indésirables principalement hématologiques. En effet, ce médicament inhibe également la protéine JAK2 sauvage et donc l'hématopoïèse normale. Il paraît donc important de privilégier de nouvelles thérapies des NMP possédant une meilleure spécificité vis-à-vis des cellules tumorales. Il a été montré, dans des modèles murins, que des cellules tumorales de poumons étaient plus sensibles à une inhibition de l'autophagie que les cellules saines. Inhiber l'autophagie en combinaison avec le ruxolitinib pourrait donc permettre d'améliorer le

ciblage thérapeutique des cellules qui expriment la mutation JAK2<sup>V617F</sup> et donc de limiter l'apparition d'effets indésirables liés au ruxolitinib.

Sur la base de ces données, l'objectif général de ce projet de thèse a donc été de déterminer l'implication de l'autophagie dans la résistance thérapeutique au ruxolitinib des NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

## II. OBJECTIFS :

Ce travail de thèse a consisté dans un premier temps à évaluer si l'autophagie était modulée par un traitement au ruxolitinib dans les NMP. Dans un second temps, l'objectif a été de caractériser l'implication de l'autophagie dans la résistance des cellules tumorales au ruxolitinib *in vitro*. Cette étude a été menée en parallèle sur des cellules hématopoïétiques saines afin d'investiguer si l'inhibition de l'autophagie affectait également l'hématopoïèse normale. Par ailleurs, ce travail a visé à déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels l'inhibition de JAK2<sup>V617F</sup> par le ruxolitinib impacte le processus d'autophagie. Enfin, la relevance fonctionnelle du ciblage de l'autophagie, en combinaison avec le ruxolitinib, a été évaluée *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules JAK2-mutées dans des souris NSG.





# **RÉSULTATS**

## I. CONTEXTE :

L'efficacité limitée du ruxolitinib ainsi que l'apparition d'effets indésirables rend nécessaire une meilleure optimisation de ce traitement afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. Dans ce contexte, le rôle de l'autophagie dans la réponse au ruxolitinib n'a été que peu étudié.

## II. RÉSULTATS MAJEURS :

Cette étude a montré dans un premier temps que l'autophagie était rapidement induite sous traitement au ruxolitinib dans des lignées cellulaires et des cultures primaires de cellules de patients exprimant la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. Nous avons par la suite démontré que cette autophagie induite par le ruxolitinib était cytoprotectrice. En effet, son inhibition sensibilise ces mêmes cellules à l'inhibiteur de JAK2. De manière intéressante, l'inhibition de l'autophagie n'a pas augmenté les effets du ruxolitinib sur des cellules hématopoïétiques saines, suggérant que ce traitement induit une autophagie cytoprotectrice uniquement dans les cellules tumorales qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. D'un point de vue mécanistique, l'induction de l'autophagie suite à l'inhibition de JAK2 par le ruxolitinib est dépendante de la protéine phosphatase PP2A. Ainsi, le ruxolitinib augmente l'activité de PP2A mesurée à l'aide d'un kit immuno-colorimétrique et son inhibition bloque l'induction de l'autophagie observée sous inhibition de JAK2. En outre, cibler PP2A reproduit les effets obtenus avec les inhibiteurs de l'autophagie. C'est-à-dire, une sensibilisation au ruxolitinib uniquement des cellules qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. Enfin, le rôle cytoprotecteur de l'autophagie a été validé *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules mutées pour JAK2 dans des souris NSG. Dans ce modèle, inhiber l'autophagie en combinaison avec le ruxolitinib réduit la charge tumorale et prolonge la survie des souris.

D'après l'ensemble de ces résultats, inhiber l'autophagie ou son régulateur en amont, PP2A, pourrait représenter une approche thérapeutique intéressante pour augmenter l'efficacité du ruxolitinib en clinique et améliorer la spécificité du traitement vis-à-vis du clone malin.

Ce travail a été soumis à publication dans le journal *Leukemia*.

## III. ARTICLE :

**Targeting PP2A-dependent autophagy enhances sensitivity to ruxolitinib in JAK2<sup>V617F</sup> myeloproliferative neoplasms**

Courdy C.<sup>1,2</sup>, De Araujo I.<sup>1,2</sup>, Sahal A.<sup>1,2</sup>, Ducau C.<sup>1,2</sup>, Saland E.<sup>1,2</sup>, Edmond V.<sup>3</sup>, Tavitian S.<sup>4</sup>, Bertoli S.<sup>1,2,4</sup>, Cougoul P.<sup>5</sup>, Poillet L.<sup>1,2</sup>, Plo I.<sup>3</sup>, Sarry JE<sup>1,2</sup>, Manenti S.<sup>1</sup>, Mansat-De Mas V.<sup>\*1,2,6,7</sup>  
Joffre C.<sup>\*1,2,7</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), INSERM UMR1037, CNRS ERL5294, Université de Toulouse, Toulouse, France.

<sup>2</sup>Equipe labellisée La Ligue contre le Cancer 2018, Toulouse, France.

<sup>3</sup>INSERM UMR1287, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France.

<sup>4</sup>Service d'hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Université de Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

<sup>5</sup>Service de médecine interne, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Toulouse, France.

<sup>6</sup>Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, Université de Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France.

<sup>7</sup> These authors contributed equally to this work

\*Corresponding authors: Carine Joffre; Inserm, U1037, Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse (CRCT), F-31024 Toulouse cedex 3, France; Email: carine.joffre@inserm.fr; and Véronique De Mas; Laboratoire d'Hématologie, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse Oncopôle, 1 avenue Irène Joliot-Curie, 31059 Toulouse cedex 9, France

**Abstract** (200 words max)

The Janus kinase 2 (JAK2)-driven myeloproliferative neoplasms (MPNs) are chronic malignancies associated with high risk of complications and suboptimal responses to JAK inhibitors such as ruxolitinib. Therefore, better understanding cellular changes induced by ruxolitinib is required to develop new combinatory therapies to improve treatment efficacy. Here, we demonstrated that ruxolitinib induced autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> cell lines and primary MPN patient cells through the activation of protein phosphatase 2A (PP2A). Inhibition of autophagy or PP2A activity along with ruxolitinib treatment reduced proliferation and increased death of JAK2<sup>V617F</sup> cells. Accordingly, proliferation and clonogenic potential of JAK2<sup>V617F</sup>-driven primary MPN patient cells, but not of normal hematopoietic cells, were markedly impaired by ruxolitinib treatment with autophagy inhibitor or PP2A inhibitor. Finally, preventing ruxolitinib-induced autophagy with a novel potent autophagy inhibitor Lys05 improved leukemia burden reduction and significantly prolonged mice overall survival compared with ruxolitinib alone. This study demonstrated that PP2A-dependent autophagy mediated by JAK2 activity inhibition contributed to the resistance to ruxolitinib. Altogether, our data support that targeting autophagy or its newly identified regulator PP2A could enhance sensitivity to ruxolitinib of JAK2<sup>V617F</sup> MPN cells and improve MPN patient care.

## Introduction

The Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation is an activating JAK2 tyrosine kinase mutation detected in the majority of MPN patients with polycythemia vera (PV), and in half of those with essential thrombocytemia (ET) and primary myelofibrosis (MF) (1-4). Its discovery in 2005 has been decisive not only for diagnosis, but also for the understanding of myeloproliferative neoplasms (MPN) pathogenesis, and has provided a rationale for the development of targeted therapy approaches.

Current JAK2 inhibitors approved for MPN patients' treatment are ruxolitinib and more recently fedratinib. These two type I inhibitors target the active conformation of JAK2 ATP binding site, thereby interfering with JAK2 catalytic activity (5). Ruxolitinib, a JAK1/JAK2 inhibitor, represents a clinical standard of care for patients with intermediate or high-risk MF (6), and has also been approved for patients with PV resistant or intolerant to hydroxyurea (7). Ruxolitinib treatment shows important benefits for MPN patients, characterized by a reduction of splenomegaly, symptom burden, blood counts and inflammation in MF and PV, and even increased survival in MF (8,9). However, since this inhibitor targets both wild type and mutated JAK, it has important toxic side effects, as well as a limited efficacy. Indeed, decrease in the clone size, measured by a reduction in mutant allele burden, is usually modest and the response can be lost during prolonged exposure (6). Several mechanisms of resistance to JAK2 inhibitors have already been identified such as JAK-STAT reactivation by JAK family heterodimer formation (10), or additional mechanisms reviewed in Meyer et al, 2017 but pre-clinical application for different therapeutic options is still undergoing. Therefore, to overcome this resistance, a better understanding of the molecular mechanisms involved is required to develop new and more effective therapeutic approaches.

Autophagy is a catabolic process that degrades and recycles intracellular components, such as damaged organelles and macromolecules, as an adaptive survival mechanism activated

during cellular stresses. However, autophagy is not only a lysosomal degradation pathway, it is also a regulator of cellular metabolism and a mechanism involved in tumor initiation/progression and therapeutic resistance in many cancers (11). Indeed, various oncogenes, such as BCR-ABL1 or FLT3-ITD, were reported to support high levels of basal autophagy sustaining cell proliferation and leukemogenesis in chronic myeloid leukemia (CML) or in acute myeloid leukemia (AML) respectively (12-14). Moreover, in CML expressing BCR-ABL1, autophagy is induced following *in vitro* tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment and its pharmacological inhibition potentiates treatment efficacy (15). These results suggest that autophagy may be involved not only in leukemogenesis, but also in cells resistance to TKI inhibitors, and represents a potential attractive approach in these hematological malignancies especially in MPN. Indeed, authors recently showed that ruxolitinib induces autophagy in a JAK2<sup>V617F</sup> mutated cell line and that pharmacological inhibition of autophagy increased ruxolitinib-induced apoptosis in this model (16,17). However, the contribution of autophagy to ruxolitinib resistance in *in vivo* models and in MPN patient cells and the underlying mechanisms are currently unknown.

Here, we show that ruxolitinib induces a cytoprotective autophagy, through a previously uncharacterized signaling pathway involving the phosphatase PP2A. Moreover, autophagy or PP2A inhibition enhances sensitivity to ruxolitinib treatment. Thus, this study reports autophagy or more precisely PP2A-dependent autophagy as a new therapeutic target able to sensitize cells to ruxolitinib treatment and to improve patients' care.

## **Materials and methods**

### **Cell lines culture and treatments.**

The human cell lines HEL (expressing JAK2<sup>V617F</sup>), SET-2 (expressing both JAK2<sup>V617F</sup> and JAK2<sup>WT</sup>) and HL60 (expressing JAK2<sup>WT</sup>) were purchased from the Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Leibniz, Germany). Cells were grown in RPMI 1640 medium with Glutamax (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco).

Ruxolitinib and LB-100 were purchased from Selleck Chemicals (Houston, TX, USA). These drugs were used at a concentration of 1 $\mu$ M and 2.5 $\mu$ M respectively, apart for clonogenic assays where they were used at 250nM and 1 $\mu$ M. Bafilomycin (25nM) was purchased from Invivogen (Toulouse, France). Chloroquine and Lys05 were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, MO, USA). Chloroquine was used at 20 $\mu$ M in cell lines, 10 $\mu$ M in primary cultures and 3 $\mu$ M for clonogenic assays. Lys05 was used *in vitro* at a concentration of 5 $\mu$ M except for clonogenic assays in which it was used at 1 $\mu$ M. SAR405 (3 $\mu$ M) and Okadaic acid (OA, 5nM) were purchased from APExBIO (Houston, TX, USA) and Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) respectively.

### **Patient Samples.**

Primary MPN patients cells have been obtained after informed consent from HIMIP collection (BB-0033-00060). According to the French law, HIMIP collections has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC 2008-307 collection 1) and obtained a transfer agreement (AC 2008-129) after approbation by the "Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outremer II" (ethical committee). Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés ie Data processing and Liberties National Committee).



Normal PBMC were obtained from blood samples of healthy donors (EFS, Etablissement Français du Sang, Toulouse, France). EFS is a governmental agency collecting and delivering blood products, all procedures in use at EFS are defined by the Law. Briefly, mononuclear cells were separated by Ficoll-Paque density gradient centrifugation and incubated in Erythrocytes Lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) to remove remaining red blood cells. CD34<sup>+</sup> cells were then sorted using EasySep™ Human CD34 positive selection kit II (17856, Stemcell Technologies, Vancouver, Canada) according to the manufacturer's instructions. Before immunofluorescence analysis, cells were cultured during 24h in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum. For cell counting and flow cytometry assays, cells are kept in IMDM supplemented with 15% BIT (Stemcell Technologies), 3U/ml erythropoietin, 50ng/ml Stem Cell Factor and 25ng/ml interleukin-3. Cytokines were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

#### **Antibodies and reagents.**

The following antibodies from Cell Signaling Technology were used: rabbit antibodies against LC3B (2775), P-STAT5 Y694 (9351), STAT5 (9363), P-P70S6K T421/S424 (9204), P70S6K (2708), P-ULK1 S757 (14202), P-ULK1 S638 (14205), P-ULK1 S555 (5869), ULK1 (6439), P-ATG14 S29 (92340), ATG14 (5504). Mouse antibodies against P-AMPK T172/T183 (sc-101630) and AMPK (sc-25792) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Mouse anti-actin (MAB1501) was purchased from Millipore (Burlington, MA, USA). Rabbit anti-LC3B (PM036) from MBL (Woburn, MA, USA) was used for immunofluorescence analysis. Secondary antibodies anti-rabbit and anti-mouse labeled with horseradish peroxidase were purchased from Promega (Madison, WI, USA) and anti-rabbit-AlexaFluor488 was purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). For flow cytometry analysis, the antibody anti-hCD45-V450, Annexin-V-FITC and Cell Viability Stain from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) were used.

#### **Western blot analysis.**

Proteins were separated using 4-12% gradient poly-acrylamide SDS-PAGE gels (Life Technologies) and electrotransferred to 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). After blocking with Tris-Buffered Saline with 0.1% Tween and 3% bovine serum albumin, membranes were incubated overnight at 4°C under continuous shaking with the appropriate primary antibodies. Primary antibodies were detected using the appropriate secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase. Immunoreactive bands were visualized by enhanced chemiluminescence with a Syngene camera. Densitometric analyses of immunoblots were performed using the GeneTools software.

### **Immunofluorescence analysis.**

Cells were seeded onto glass slides coated with cell-tak (Corning, Corning, NY, USA), then fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min. After PBS washes, cells were incubated in 0.01% saponin with 3% bovine serum albumin for 30 min and then incubated with anti-LC3B antibody (1/800) for 40 min. Cells were then washed before incubation with secondary antibody (1/800) for 30 min, followed by PBS and distilled H<sub>2</sub>O washes and mounting in ProLong™ Gold antifade medium with DAPI (4'6-diamidino-2-phenylindole, Invitrogen). Images were acquired using a confocal Zeiss LSM 780. For quantifications, fields were arbitrarily chosen based on DAPI staining, and the number of LC3B dots per cell was determined with Image J software.

### **Flow cytometry analysis.**

To determine the number of apoptotic and dead cells, cells were washed and resuspended in 100 $\mu\text{l}$  of Annexin-V binding buffer plus 2 $\mu\text{l}$  of Annexin-V-FITC and 5 $\mu\text{l}$  of Cell Viability Stain. Data were acquired on a Macsquant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) flow cytometer and analyzed with FlowJo v10 software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA).

### **Clonogenic assays.**

Sorted human peripheral blood CD34+ cells were plated in duplicate at 3000 cells per ml of methylcellulose medium (H4230, Stemcell Technologies) supplemented with 3U/ml

erythropoietin, 50ng/ml Stem Cell Factor and 25ng/ml interleukin-3. Erythroid colonies were scored at day 14.

#### **Tumor xenografts into NSG mice.**

Animals were used for transplantation of HEL cell lines in accordance with a protocol reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Région Midi-Pyrénées (France). *NOD/LtSz-SCID/IL-2R $\gamma$ chain null* (NSG) mice were produced at the Genotoul Anexplo platform in Toulouse (France) using breeders obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, NC, USA). Mice were housed in sterile conditions using HEPA-filtered micro-isolators, and fed with irradiated food and sterile water. Eight-week-old mice were sublethally treated with busulfan (20 mg/kg) 24h before injection of HEL cells. Cells were washed in PBS, and suspended in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) at a final concentration of  $2 \times 10^6$  cells per 200  $\mu$ L of HBSS per mouse for tail vein injection. Mice were then treated from day-3 post cells injection, every day, by oral gavage with a vehicle or with 120 mg/kg of ruxolitinib and by intraperitoneal injections with a vehicle or Lys05 at 32 mg/kg. Ruxolitinib was solubilized in DMSO and extemporaneously diluted in water containing 0.5% methylcellulose and 0.1% Tween80 before administration to mice. Lys05 was solubilized in PBS. Mice were sacrificed after 14 days to harvest human cells from murine bone marrow. Engraftment in bone marrow was analyzed by flow cytometry using hCD45-V450 marker. Mice survival time was also determined. Survival significance was determined by Kaplan–Meier curve and log-rank test.

#### **PP2A phosphatase activity assay.**

PP2A phosphatase activity was determined using the PP2Ac immunoprecipitation phosphatase assay kit (17-313, Millipore). Briefly, cells were lysed with a buffer containing 2% CHAPS, 20mM Tris-HCl pH7.4, 137mM NaCl, 2mM EDTA, 10% Glycerol and protease inhibitors (Roche, Basel, Switzerland). 100 $\mu$ g of protein lysate, 4 $\mu$ g of PP2Ac antibody and 25 $\mu$ l of protein A-agarose beads were incubated for PP2Ac immunoprecipitation at 4°C for 2h. Immunoprecipitates were then used in the phosphatase reaction according to the

manufacturer's instructions. After colorimetric assay, results were normalized to the PP2Ac immunoprecipitation efficacy assessed by western blot.

**Statistical analysis.**

Data from at least three independent experiments are reported as means  $\pm$  standard error of the mean. Unpaired two-tailed Student's t-tests with Welch's correction were carried out with Prism 8 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## Results

### Ruxolitinib enhances autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> cells.

Although recent data from the literature indicate that ruxolitinib treatment induces autophagy in cell lines harboring the JAK2<sup>V617F</sup> mutation *in vitro* (16,17), compelling data about the impact of ruxolitinib on autophagy in MPN patients and *in vivo* are still needed. Therefore, to deeply investigate ruxolitinib effect on autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> model, we first treated human JAK2<sup>V617F</sup> cells from two HEL and SET-2 cell lines and eight primary PV patients with ruxolitinib (1 $\mu$ M) for 2 hours. Bafilomycin (baf) or chloroquine, two autophagy inhibitors were used to monitor the autophagic flux. As expected and as shown in Figure 1A, ruxolitinib reduced STAT5 phosphorylation level in JAK2 cell lines. In addition, in association with bafilomycin, ruxolitinib increased lipidated LC3 (LC3B-II) accumulation, an autophagosomal membrane marker, compared to bafilomycin alone in HEL and SET-2 cell lines. This effect lasted even following 24 hours of ruxolitinib treatment (Supplementary Figure 1A). Accordingly, the average number of autophagosomes per cell was significantly increased upon ruxolitinib treatment compared to control in both cell lines as measured by LC3B immunofluorescence (Figure 1B). We confirmed these results on eight JAK2<sup>V617F</sup> MPN patient samples (Supplementary Table 1). We isolated cells from phlebotomy followed by CD34+ purification as described in Figure 1C and we treated them with ruxolitinib with or without chloroquine. Ruxolitinib combined with chloroquine led to an increase in autophagosome number in JAK2<sup>V617F</sup> primary cells compared to treatments alone, as previously observed in JAK2<sup>V617F</sup> cell lines (Figure 1D). Interestingly, ruxolitinib modified neither P-STAT5 level, nor conversion of LC3B-I into LC3B-II (Figure 1E) or the number of autophagosomes (Figure 1F) in JAK2 wild type HL60 AML cell line, indicating that ruxolitinib effect on autophagy requires JAK2 inhibition. To definitively rule out ruxolitinib off-target effects, we investigated the impact of two other JAK2 inhibitors on autophagy response (18): fedratinib, a clinically-used type I inhibitor as

ruxolitinib, and CHZ868, a type II inhibitor, that respectively target the ATP binding site under active or inactive conformation. Similar to ruxolitinib, fedratinib and CHZ868 both induced LC3B-II accumulation when combined to bafilomycin, compared to bafilomycin alone in JAK2<sup>V617F</sup> cells (Supplementary Figure 1B).

Altogether, these complementary biochemical and cellular data demonstrate that autophagy is induced early upon ruxolitinib treatment, and more generally upon JAK2 inhibition in JAK2<sup>V617F</sup> models (*i.e.* cell lines and primary cells).

### **Targeting autophagy increases ruxolitinib efficacy in JAK2<sup>V617F</sup> cells.**

We next sought to determine whether ruxolitinib-induced autophagy is cytotoxic or cytoprotective in JAK2<sup>V617F</sup> expressing cells. Therefore, we assessed the impact of combining ruxolitinib with different autophagy inhibitors (*e.g.* chloroquine and SAR405) on cell number and viability in JAK2<sup>V617F</sup> models. We first checked the effectiveness of autophagosome formation inhibition by SAR405 (19), a lipid kinase VPS34 inhibitor. As shown in Supplementary Figure 2A, the levels of LC3B-II were strongly reduced in HEL cells treated with SAR405 in combination with bafilomycin compared to bafilomycin alone. Then, we observed that ruxolitinib combination with SAR405 or chloroquine significantly decreased cell number and increased cell death compared to ruxolitinib alone in HEL and SET-2 cell lines (Figures 2A,B). Moreover, ruxolitinib combination with chloroquine or SAR405 compared to the drugs alone also led to a significant reduction in MPN patient cells number (Figure 2C) but not of cell death (Figure 2D). Of note, only chloroquine enhanced ruxolitinib-induced MPN patient cells death, suggesting that the observed phenotype with chloroquine is not related to autophagy inhibition. We also performed a colony formation assay to study the impact of ruxolitinib treatment in the presence or absence of autophagy inhibitors on the ability of MPN patients' single cells to form erythroid clones. We observed that while ruxolitinib had a limited efficacy at reducing clonogenic properties of MPN patient cells, its combination with either chloroquine or SAR405 significantly decreased the number of erythroid clones compared with the drugs alone (Figures 2E and Supplementary 2B). Conversely, those results were not

observed with normal hematopoietic cells (Supplementary Table 1). In fact, ruxolitinib combination with autophagy inhibitors had no impact on hematopoietic cell number or viability (Figures 2F,G). Moreover, ruxolitinib combination with SAR405 did not reduce the number of erythroid clones formed from normal hematopoietic cells compared to ruxolitinib treatment alone (Figure 2H). The fact that chloroquine, but not SAR405, increased ruxolitinib cytotoxic effects on JAK2 wild type erythroid clones indicates that this is not related to autophagy inhibition. Thus, these data together with the results obtained on the JAK2 WT HL60 cell line (Figures 1E,F), suggest that ruxolitinib does not induce autophagy in JAK2 WT cells.

Altogether, our data show that ruxolitinib-induced autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> cells is cytoprotective and that its pharmacological inhibition sensitizes those cells to ruxolitinib. These findings suggest that autophagy inhibition could improve the limited efficacy of ruxolitinib observed in clinics.

### **Protein-phosphatase 2 A (PP2A) is involved in ruxolitinib-induced autophagy**

Then, we wanted to investigate the molecular mechanisms by which ruxolitinib induces autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> MPN cells. We first evaluated the potential role of mTORC1 and AMPK, two major signaling pathways involved in autophagy regulation. As previously described in the literature, mTORC1 was inhibited upon ruxolitinib treatment (16), as shown by a decrease in the phosphorylated form of P70S6K, one of its *bona fide* substrates (Figure 3A). As mTORC1 is a well-known negative regulator of autophagy (20), its inhibition appeared therefore to be a potential candidate responsible for the autophagy induction observed upon ruxolitinib treatment. mTORC1 inhibits autophagy through phosphorylation of ULK1 kinase on serines 757 and 638 (21,22). However, as shown in Figure 3, these ULK1 phosphosites were not modified upon ruxolitinib treatment (Figure 3A). Moreover, the phosphorylation of AMPK and its direct downstream target, the ULK1 serine 555, were either not modified upon ruxolitinib treatment (Figure 3A). These results suggest that ruxolitinib-dependent autophagy induction is not due neither to mTORC1 inhibition nor to AMPK activation.

Previous studies described that PP2A phosphatase may be repressed downstream JAK2<sup>V617F</sup> in murine cell lines, as JAK2 inhibition by JAK2 inhibitor type I increases its activity (23). Moreover, PP2A has also been shown to trigger autophagy upon amino acid starvation in human fibrosarcoma cell lines (24). Based on these observations, we hypothesized that PP2A could be involved downstream JAK2<sup>V617F</sup> in ruxolitinib-induced autophagy. To address this question, we used a well-known inhibitor of PP2A, the okadaic acid (OA), at a low concentration (5nM) to specifically target PP2A (25), and we first monitored PP2A activity using an immunocolorimetric assay (23). As shown in Figure 3B and in accordance with data from the literature, ruxolitinib treatment significantly increased PP2A activity in HEL cells. Moreover, OA prevented the ruxolitinib-induced PP2A activity thus indicating that OA, at this concentration, efficiently inhibits PP2A activity. We then used OA to modulate PP2A activity and evaluated whether this phosphatase is involved in ruxolitinib-induced autophagy. Interestingly, OA abrogated the increase of LC3-II accumulation and autophagosomes number (Figures 3C,D and Supplementary Figures 3A,B) triggered by ruxolitinib in both JAK2<sup>V617F</sup> cell lines. Furthermore, FTY720, a PP2A activating drug (23,26) increased autophagy flux (Supplementary Figure 3C) and autophagosomes number (Supplementary Figure 3D). Collectively, these data indicate that PP2A is activated upon JAK2 inhibition and is responsible, at least in part, for the autophagy induction observed upon ruxolitinib treatment.

### **Protein-phosphatase 2 A (PP2A) inhibition enhances ruxolitinib cytotoxicity**

Since targeting autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> model enhances ruxolitinib effects (Figure 2), inhibiting PP2A activity, responsible for autophagy induction, could also represent an interesting strategy to improve ruxolitinib efficacy. To investigate this point, we treated primary cells from MPN patients with OA alone, to inhibit PP2A activity, or in combination with ruxolitinib. Similar to autophagy inhibition (Figures 2C-E), this new drug combination significantly increased the impact of ruxolitinib on MPN cells number (Figure 3E), did not modify cell death (Figure 3F) and strongly reduced erythroid clone number (Figure 3G) compared to ruxolitinib alone. Importantly, OA did not potentiate ruxolitinib effects on normal hematopoietic



cells from healthy donors (Figures 3H-J), as previously described for autophagy inhibition (Figures 2F-H). Consistent with the data obtained with OA, more selective PP2A inhibitor LB-100 (27) prevented ruxolitinib-induced autophagy (Supplementary Figures 3E,F) and increased the ruxolitinib effect on MPN patients' erythroid clones number (Supplementary Figure 3G). These results confirm that PP2A-dependent autophagy activation by ruxolitinib limits the effects of this TKI.

**Targeting autophagy enhances survival of ruxolitinib-treated mice engrafted with JAK2<sup>V617F</sup> cells.**

To test the functional relevance of targeting autophagy in combination with ruxolitinib, we daily treated NOD-SCID-gamma (NSG) immunodeficient mice engrafted with HEL cells, with a potent autophagy inhibitor, the Lys05 (Figure 4A). We first validated that this lysosomotropic agent, more potent than chloroquine (28,29) phenocopied the results obtained *in vitro* with other autophagy inhibitors on cell number, viability and clonogenic properties. As observed with chloroquine or SAR405, Lys05 treatment strongly enhanced cytotoxic effects of ruxolitinib in JAK2<sup>V617F</sup> cell lines (Supplementary Figure 4A) and robustly reduced the number of erythroid clones from MPN patients' cells (Supplementary Figure 4B). In addition, *in vivo* experiments demonstrated that Lys05 improved the response to ruxolitinib. In fact, mice engrafted with HEL cells and treated with Lys05 plus ruxolitinib displayed a higher reduction of the percentage of human CD45+ cells present in the bone marrow (Figure 4B). Accordingly, as splenomegaly reduction is a hallmark of therapy efficacy, spleen weight of mice treated with the drug combination was measured and we observed a decrease compared to ruxolitinib treatment alone (Figure 4C and Supplementary Figure 4C). Moreover, treatment with ruxolitinib plus Lys05 was significantly more efficient in enhancing mice survival than JAK2 inhibitor alone (Figure. 4D).

In summary, our data reveal, for the first time, that autophagy inhibition potentiates the effect of ruxolitinib and improves the overall survival *in vivo*.

Altogether, our findings, by providing a better understanding on the molecular and cellular mechanisms triggered by ruxolitinib, identified the PP2A-autophagy axis as a novel therapeutic target in MPN. This indicates that combining ruxolitinib with either autophagy or PP2A inhibitors could improve ruxolitinib response in MPN patients.

## Discussion

In this work, we show that JAK2 inhibitors such as ruxolitinib induced autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> cells. Ruxolitinib has been previously reported as an autophagy inducer in one JAK2<sup>V617F</sup> cell line (17). Our results further demonstrate that autophagy is induced upon ruxolitinib treatment in both cell lines expressing JAK2<sup>V617F</sup> and primary JAK2<sup>V617F</sup> patient cells. We also observed that the ruxolitinib-induced autophagy is cytoprotective. Interestingly, the autophagy induction was not found in their WT counterpart, indicating that targeting autophagy in MPN JAK2<sup>V617F</sup> patients may selectively target malignant hematopoietic cells. *In vivo* experiments confirmed those data as autophagy inhibition enhanced ruxolitinib efficacy and overall mice survival. Otherwise, ruxolitinib is not the unique TKI able to induce autophagy. Indeed, imatinib and crizotinib have the same effect in BCR-ABL1 chronic myeloid leukemia and ALK-anaplastic cell lymphoma respectively (15,30). Autophagy has been shown to play an important role in therapeutic resistance in hematological malignancies (for review see (31-33)). Studies have reported that imatinib induces autophagy in leukemic stem cells (LSCs) from CML and that autophagy inhibition in combination with TKI leads to LSCs elimination (28,34). Overall, these data indicate that autophagy represents a promising therapeutic target in several hematological malignancies expressing specific oncogenes.

However, the molecular mechanisms underlying the autophagy-dependent resistance are still understudied. JAK2-mutated MPN cells display an elevated glycolysis and an increased mitochondrial metabolism (35) necessary to support their high demand in energy. Interfering with their exacerbated metabolism reduced cell proliferation and survival, effects that were amplified when combined with ruxolitinib. However, ruxolitinib probably affects mitochondrial respiration modestly, explaining its moderate impact on cell proliferation and death (35). These

results suggest that alternative mechanisms, supporting metabolic pathways are occurring upon ruxolitinib. In this study, we demonstrated that ruxolitinib induces autophagy, a well-known regulator of cell metabolism (36) and especially of oxidative metabolism in hematological malignancies (37). We can speculate that this autophagy could therefore limit drug efficacy *in vitro* and *in vivo* through its ability to sustain cell metabolism. Future research is warranted to decipher if and how autophagy maintains elevated oxidative phosphorylation upon ruxolitinib treatment explaining how autophagy participates to ruxolitinib resistance.

Here, we identified PP2A as an important modulator downstream of JAK2<sup>V617F</sup>. Upon activation, wild-type JAK2 was described to directly interact and inactivate PP2A (38), indicating that PP2A exerts a negative role on JAK2-mediated signal transduction. Mutated JAK2 was also shown to inactivate PP2A in murine Ba/F3-JAK2<sup>V617F</sup> cells through the PI3K-γ-PKC-induced phosphorylation of the PP2A inhibitor SET (23). In this study, PP2A activation with PP2A activating drug (PAD) decreases leukemic burden and extends significantly overall mice survival in an immunodeficient mouse model for leukemic cell engraftment, indicating that PADs have a strong anti-leukemic activity. These findings are somewhat opposite to what we describe. Indeed, we demonstrated that inhibiting PP2A in MPN patients' cells in combination with ruxolitinib reduces more efficiently their clonogenic properties than ruxolitinib alone, indicating that the PP2A activation induced by JAK2 inhibition favors MPN cells proliferation and survival. PP2A is a family of more than two hundreds heterotrimeric complexes composed of a combination of one catalytic subunit, one scaffold subunit and one of many possible B regulatory subunits. Different B subunits were shown to display opposite impact on mutated JAK2. Indeed, the B56 $\alpha$  subunit of the PP2A complex repressed JAK2<sup>V617F</sup> activity whereas the B56 $\gamma$  one favors JAK2<sup>V617F</sup> phosphorylation (39). Therefore, different PP2A complexes have opposite role on MPN and we could speculate that is it not the same PP2A complex that is engaged upon ruxolitinib than the one activated by PADs.

In addition, different PP2A complexes are implicated in autophagy regulation. On one hand, PP2A-PP2R3B was shown to dephosphorylate ATG4B that allows LC3 processing and therefore autophagosome expansion (40). On another hand, the PP2A-B55 $\alpha$  complex by dephosphorylating ULK1, relieves an inhibitory phosphorylation site required for its activation and so for autophagosome formation (24). For instance, different PP2A complexes activity, independently of mTORC activity, positively modulate autophagy by acting either at early or late steps of the autophagy process. PP2A can also control autophagy at the transcriptional level. In fact, the dephosphorylation of the transcription factor TFEB by PP2A induces its nuclear localization followed by the transcription of genes involved in autophagy and lysosomal functions (41). Further studies are therefore needed to identify which specific subsets of PP2A is responsible for ruxolitinib-induced autophagy and what are the autophagy regulatory proteins involved. Targeting specifically the correct PP2A complex rather than all PP2A complexes is necessary to improve therapy efficacy.

Interestingly, similar to autophagy inhibition, metformin increases ruxolitinib efficacy in cell lines harboring the JAK2<sup>V617F</sup> mutation (39). Since, metformin was recently shown to inhibit autophagy in AML cell lines (37), we can therefore speculate that metformin enhances the negative role of ruxolitinib on cell growth through its inhibitory action on autophagy. Hence, metformin could, as an autophagy inhibitor, represent a new therapeutic option in combination with ruxolitinib for the treatment of JAK2<sup>V617F</sup> MPN patients.

Ruxolitinib response is often short-lived due to the development of resistance and combination therapy therefore appeared to be essential to improve therapeutic response of MPN patients expressing the mutated JAK2<sup>V617F</sup>. Our findings demonstrated that autophagy is induced upon JAK2 inhibition by TKI and that inhibiting this degradative pathway improves ruxolitinib efficacy both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, we found that PP2A activation is involved in the ruxolitinib-induced autophagy and targeting this phosphatase together with ruxolitinib impede cell proliferation and survival of JAK2 mutated cells.

Collectively, these data support rational for a clinical trial to assess the efficacy of JAK2 and PP2A-dependent autophagy inhibition in MPN patients expressing JAK2<sup>V617F</sup> mutant.

### **Acknowledgements**

We thank CREFRE for mice experimentation. We are grateful to Manon Farcé and Laetitia Ligat for assistance with flow cytometry and microscopy, respectively. We are very grateful to nurses from the Hematology service of IUCT-O (Toulouse) for providing us access to blood samples of MPN patients. We thank Anne-Marie Bénot and Latifa Jarrou for administrative support. This work is partly supported by labellisation Ligue Nationale de Lutte contre le cancer, the Fondation Toulouse Cancer Santé, and the association GAEL. Charly Courdy is a recipient of la Ligue Nationale contre le Cancer. Team JE Sarry is a member of OPALE Carnot Institute, The Organization for Partnerships in Leukemia.

### **Authors contributions**

IDA made preliminaries experiments. CC performed most of the experimentation. ST, SB, PC provided patients' samples. VE, IP, ES, CJ, CD, LP and AS helped for mice experimentation. CC, JES, SM, VDM and CJ conceived and designed the experimentation. CC, VDM and CJ wrote the manuscript.

### **Competing Interests**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **Data Availability Statement**

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request.

## References

1. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19;365(9464):1054–61.
2. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779–90.
4. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387–97.
5. Brkic S, Meyer SC. Challenges and Perspectives for Therapeutic Targeting of Myeloproliferative Neoplasms. *Hemasphere*. 2021 Jan;5(1):e516.
6. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, DiPersio JF, Catalano JV, et al. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol*. 2017 Feb 22;10(1):55.
7. Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F, et al. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2015 Jan 29;372(5):426–35.
8. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoop L, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*. 2016 Aug;30(8):1701–7.
9. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013 Jan 3;368(1):22–33.
10. Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, Manshouri T, Adli M, Hricik T, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature*. 2012 Sep 6;489(7414):155–9.
11. Poillet-Perez L, Sarry JE, Joffre C. Autophagy is a major metabolic regulator involved in cancer therapy resistance. *Cell Rep*. 2021 Aug 17;36(7):109528.
12. Altman BJ, Jacobs SR, Mason EF, Michalek RD, MacIntyre AN, Coloff JL, et al. Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis. *Oncogene*. 2011 Apr 21;30(16):1855–67.

13. Colecchia D, Rossi M, Sasdelli F, Sanzone S, Strambi A, Chiariello M. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy*. 2015 Oct 3;11(10):1790–802.
14. Heydt Q, Larrue C, Saland E, Bertoli S, Sarry JE, Besson A, et al. Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2018 Feb 8;37(6):787–97.
15. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 2009 May;119(5):1109–23.
16. Ishida S, Akiyama H, Umezawa Y, Okada K, Nogami A, Oshikawa G, et al. Mechanisms for mTORC1 activation and synergistic induction of apoptosis by ruxolitinib and BH3 mimetics or autophagy inhibitors in JAK2-V617F-expressing leukemic cells including newly established PVT1-2. *Oncotarget*. 2018 Jun 1;9(42):26834–51.
17. Machado-Neto JA, Coelho-Silva JL, Santos FP de S, Scheucher PS, Campregher PV, Hamerschlak N, et al. Autophagy inhibition potentiates ruxolitinib-induced apoptosis in JAK2V617F cells. *Invest New Drugs*. 2020 Jun;38(3):733–45.
18. Vainchenker W, Leroy E, Gilles L, Marty C, Plo I, Constantinescu SN. JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000Res*. 2018;7:82.
19. Ronan B, Flamand O, Vescovi L, Dureuil C, Durand L, Fassy F, et al. A highly potent and selective Vps34 inhibitor alters vesicle trafficking and autophagy. *Nat Chem Biol*. 2014 Dec;10(12):1013–9.
20. Neufeld TP. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):157–68.
21. Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 22;108(12):4788–93.
22. Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X. The ULK1 complex. *Autophagy*. 2013 Feb 1;9(2):124–37.
23. Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Roof S, Harb JG, Ferenchak G, et al. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood*. 2013 Sep 12;122(11):1923–34.
24. Wong PM, Feng Y, Wang J, Shi R, Jiang X. Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nat Commun*. 2015 Aug 27;6:8048.
25. Cohen P, Klumpp S, Schelling DL. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett*. 1989 Jul 3;250(2):596–600.

26. Neviani P, Harb JG, Oaks JJ, Santhanam R, Walker CJ, Ellis JJ, et al. PP2A-activating drugs selectively eradicate TKI-resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *J Clin Invest*. 2013 Oct;123(10):4144–57.
27. Chung V, Mansfield AS, Braiteh F, Richards D, Durivage H, Ungerleider RS, et al. Safety, Tolerability, and Preliminary Activity of LB-100, an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A, in Patients with Relapsed Solid Tumors: An Open-Label, Dose Escalation, First-in-Human, Phase I Trial. *Clin Cancer Res*. 2017 Jul 1;23(13):3277–84.
28. Baquero P, Dawson A, Mukhopadhyay A, Kuntz EM, Mitchell R, Olivares O, et al. Targeting quiescent leukemic stem cells using second generation autophagy inhibitors. *Leukemia*. 2019 Apr;33(4):981–94.
29. McAfee Q, Zhang Z, Samanta A, Levi SM, Ma XH, Piao S, et al. Autophagy inhibitor Lys05 has single-agent antitumor activity and reproduces the phenotype of a genetic autophagy deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 May 22;109(21):8253–8.
30. Mitou G, Frenzel J, Desquesnes A, Le Gonidec S, AlSaati T, Beau I, et al. Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):30149–64.
31. Auberger P, Puissant A. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood*. 2017 02;129(5):547–52.
32. Du W, Xu A, Huang Y, Cao J, Zhu H, Yang B, et al. The role of autophagy in targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Autophagy*. 2020 Sep 22;1–15.
33. Joffre C, Ducau C, Poillet-Perez L, Courdy C, Mansat-De Mas V. Autophagy a Close Relative of AML Biology. *Biology (Basel)*. 2021 Jun 18;10(6):552.
34. Helgason GV, Karvela M, Holyoake TL. Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML. *Blood*. 2011 Aug 25;118(8):2035–43.
35. Rao TN, Hansen N, Hilfiker J, Rai S, Majewska JM, Leković D, et al. JAK2-mutant hematopoietic cells display metabolic alterations that can be targeted to treat myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2019 Nov 21;134(21):1832–46.
36. Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010 Dec 3;330(6009):1344–8.
37. Bosc C, Broin N, Fanjul M, Saland E, Farge T, Courdy C, et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun*. 2020 Aug 13;11(1):4056.
38. Yokoyama N, Reich NC, Todd Miller W. Determinants for the interaction between Janus kinase 2 and protein phosphatase 2A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003 Sep 1;417(1):87–95.



39. Kawashima I, Kirito K. Metformin inhibits JAK2<sup>V617F</sup> activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56 $\alpha$  subunit. *Exp Hematol.* 2016 Dec;44(12):1156-1165.e4.

40. Pengo N, Agrotis A, Prak K, Jones J, Ketteler R. A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nat Commun.* 2017 Aug 18;8(1):294.

41. Hasegawa J, Tokuda E, Yao Y, Sasaki T, Inoki K, Weisman LS. PP2A-dependent TFEB activation is blocked by PIKfyve-induced mTORC1 activity. *Mol Biol Cell.* 2022 Mar 1;33(3):ar26.

## Figure Legends

**Figure 1. Ruxolitinib increases autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> cells. A-B.** HEL and SET-2 cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor the autophagy flux. Cells were processed for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratio obtained by densitometric analysis ( $n=4 \pm$  s.e.m.), **(A)**. Cells were stained for LC3B and analyzed by confocal microscopy. Graphs represent the number of LC3B dots per cell ( $n=4 \pm$  s.e.m.), **(B)**. Scale bar: 10 $\mu$ m. **C.** Mononuclear cells from peripheral blood samples from JAK2<sup>V617F</sup>-positive MPN patients were separated by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation. CD34+ progenitors were then sorted using an immunomagnetic positive selection kit and processed for further experiments. **D.** Patient' cells obtained in **(C)** were treated or not with chloroquine (20 $\mu$ M) during 16 hours to monitor autophagy flux in combination with ruxolitinib (1 $\mu$ M) for 2 hours and stained for LC3B. Representative confocal pictures are shown and histograms represent the number of LC3B dots per cell ( $n=8 \pm$  s.e.m.). Scale bar: 10 $\mu$ m. **E-F.** JAK2<sup>WT</sup> HL60 cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux. Cells were processed

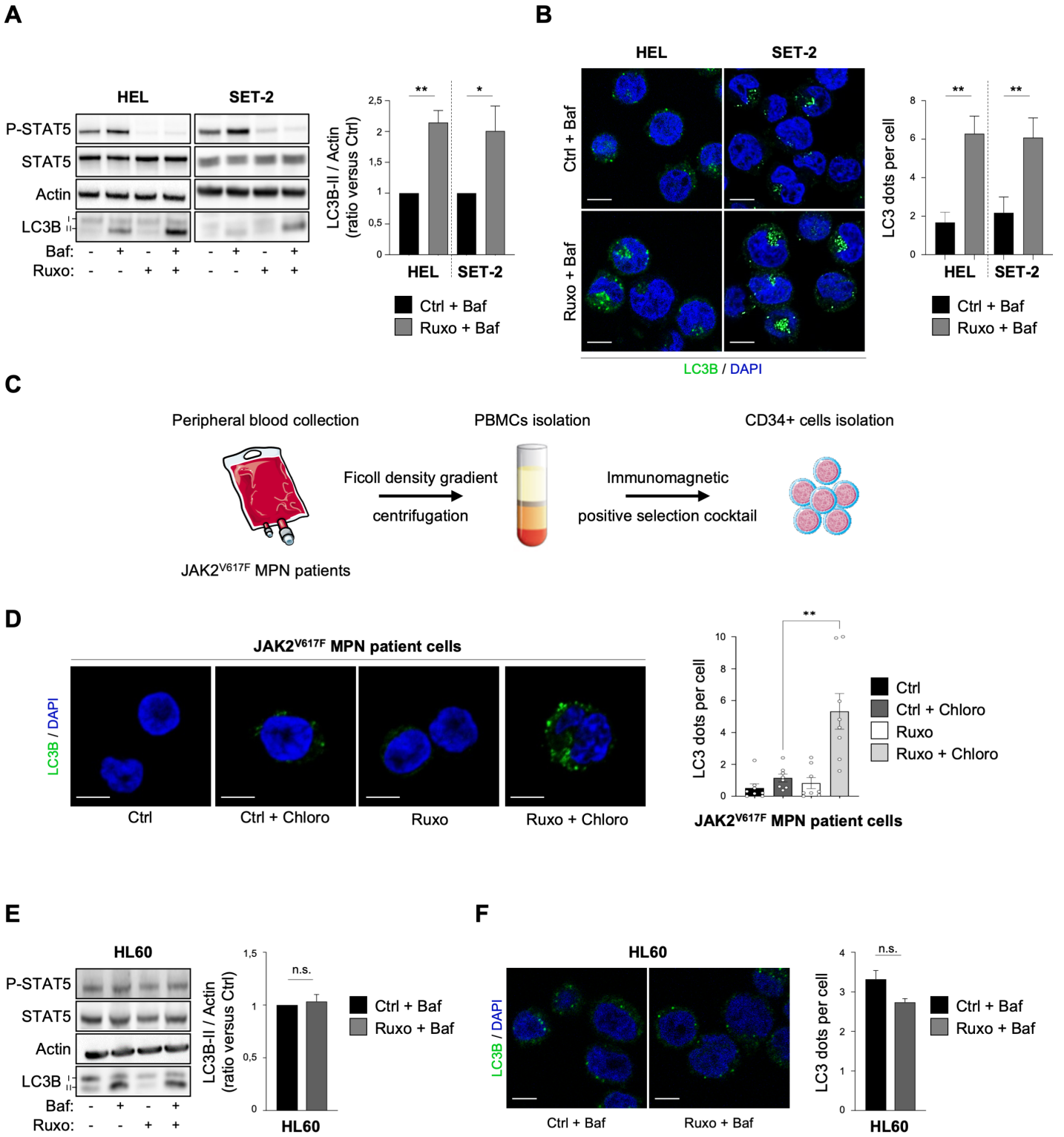
for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratio obtained by densitometric analysis ( $n=3 \pm \text{s.e.m.}$ ), (E). Cells were stained for LC3B and analyzed by confocal microscopy. Graphs represent the number of LC3B dots per cell ( $n=3$ ), (F). Scale bar:  $10\mu\text{m}$ .

**Figure 2. Autophagy inhibition enhances ruxolitinib efficacy in  $\text{JAK2}^{\text{V617F}}$  cells *in vitro*.** A-B. HEL and SET-2 cells were treated or not with ruxolitinib ( $1\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of chloroquine ( $20\mu\text{M}$ ) or SAR405 ( $3\mu\text{M}$ ). After 3 days, the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting ( $n=4 \pm \text{s.e.m.}$ ) (A) and the percentage of cell death was determined by Annexin-V labelling and flow cytometry analysis ( $n=4 \pm \text{s.e.m.}$ ) (B). C-D. CD34+ cells obtained from  $\text{JAK2}^{\text{V617F}}$ -positive MPN patient samples were treated or not with ruxolitinib ( $1\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of chloroquine ( $10\mu\text{M}$ ) or SAR405 ( $3\mu\text{M}$ ). After 2 days, the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting ( $n=6 \pm \text{s.e.m.}$ ) (C) and the percentage of cell death was determined by Annexin-V labelling and flow cytometry analysis ( $n=5 \pm \text{s.e.m.}$ ) (D). E. CD34+ cells from  $\text{JAK2}^{\text{V617F}}$ -positive MPN patient samples were plated for colony forming assay in semi-solid medium supplemented or not with ruxolitinib ( $250\text{nM}$ ) and chloroquine ( $3\mu\text{M}$ ) or SAR405 ( $3\mu\text{M}$ ). After 14 days, clonogenic potential was assessed by counting the number of BFU-E clones per dish. Data are represented as percentage of control ( $n=10 \pm \text{s.e.m.}$ ). F-G. CD34+ cells from  $\text{JAK2}^{\text{WT}}$  healthy donor samples treated or not with ruxolitinib ( $1\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of chloroquine ( $10\mu\text{M}$ ) or SAR405 ( $3\mu\text{M}$ ). After 2 days, the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting ( $n=5 \pm \text{s.e.m.}$ ) (F) and the percentage of cell death was determined by Annexin-V labelling and flow cytometry analysis ( $n=5 \pm \text{s.e.m.}$ ) (G). H. CD34+ cells from  $\text{JAK2}^{\text{WT}}$  healthy donor samples were plated for colony forming assay in semi-solid medium supplemented as indicated. After 14 days, clonogenic potential was assessed by counting the number of BFU-E clones per dish. Data are represented as percent of control ( $n=6 \pm \text{s.e.m.}$ ).

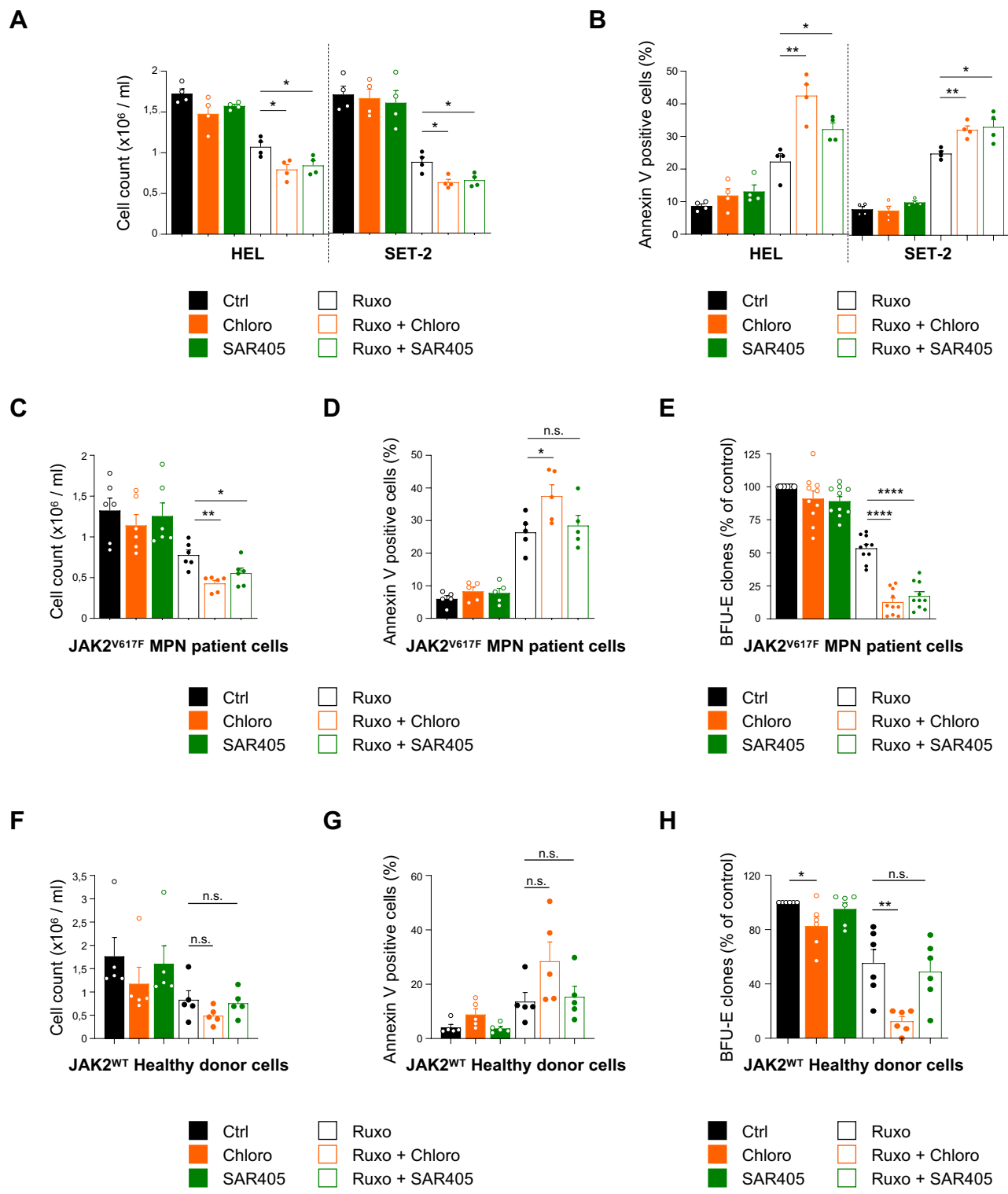
**Figure 3. Ruxolitinib-induced autophagy relies on PP2A phosphatase activation. A.** HEL cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) for 2 hours and processed for western blot analysis of the indicated proteins. Actin was used as a loading control. **B.** HEL cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) in the presence or absence of the PP2A inhibitor okadaic acid (OA) (5nM) for 2 hours and processed for PP2A activity measurement by immuno-colorimetric assay. Data are represented as percentage of control (n=3  $\pm$  s.e.m.). **C-D.** HEL cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) and OA (5nM) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux. Cells were processed for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Histograms represent the LC3B-II/actin ratio obtained by densitometric analysis (n=4  $\pm$  s.e.m.), **(C)**. Cells were stained for LC3B and analyzed by confocal microscopy. Graphs represent the number of LC3B dots per cell (n=3  $\pm$  s.e.m.), **(D)**. Scale bar: 10 $\mu$ m. **E-F.** CD34+ cells obtained from JAK2<sup>V617F</sup>-positive MPN patient samples were treated or not with ruxolitinib (1 $\mu$ M) in the presence or absence of OA (5nM). After 2 days, the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting (n=5  $\pm$  s.e.m.) **(E)** and (right panel) the percentage of cell death was determined by Annexin-V labelling and flow cytometry analysis (n=4  $\pm$  s.e.m.) **(F)**. **G.** CD34+ cells from JAK2<sup>V617F</sup>-positive MPN patient samples were plated for colony forming assay in semi-solid medium supplemented or not with ruxolitinib (250nM) and OA (5nM). After 14 days, clonogenic potential was assessed by counting the number of BFU-E clones per dish. Data are represented as percentage of control (n=10  $\pm$  s.e.m.). **H-I** CD34+ cells obtained from JAK2<sup>WT</sup> healthy donor samples were treated or not with ruxolitinib (1 $\mu$ M) in the presence or absence of OA (5nM). After 2 days, the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting (n=5  $\pm$  s.e.m.) **(H)** and the percentage of cell death was determined by Annexin-V labelling and flow cytometry analysis (n=5  $\pm$  s.e.m.) **(I)**. **J.** CD34+ cells from JAK2<sup>WT</sup> healthy donor samples were plated for colony forming assay in semi-solid medium supplemented or not with ruxolitinib (250nM) and OA (5nM). After 14 days, clonogenic potential was assessed by counting the number of BFU-E clones per dish. Data are represented as percent of control (n=6  $\pm$  s.e.m.).

**Figure 4. Targeting autophagy increases survival of ruxolitinib-treated mice xenografted with JAK2<sup>V617F</sup> cells. A-D.** NSG mice (n=14 mice per group) engrafted with 2.10<sup>6</sup> HEL cells by intravenous injection were treated with vehicle or ruxolitinib (120mg/kg/day) by oral gavage in combination or not with Lys05 (32mg/kg/day) by intraperitoneal injection. Fourteen days post-engraftment, seven mice per group were dissected to analyze the percentage of viable human cells (Annexin-V-, hCD45+) in the bone marrow by flow cytometry (n=7 ± s.e.m.), (B). Their spleens were collected and weighted. Graphs represent spleen weight related to body weight for each mouse individually (left panel; n=7 ± s.e.m.) (C). The remaining seven mice per group were used for overall survival analysis and Kaplan-Meier survival curves of engrafted mice are shown (n=7 ± s.e.m.) (D).

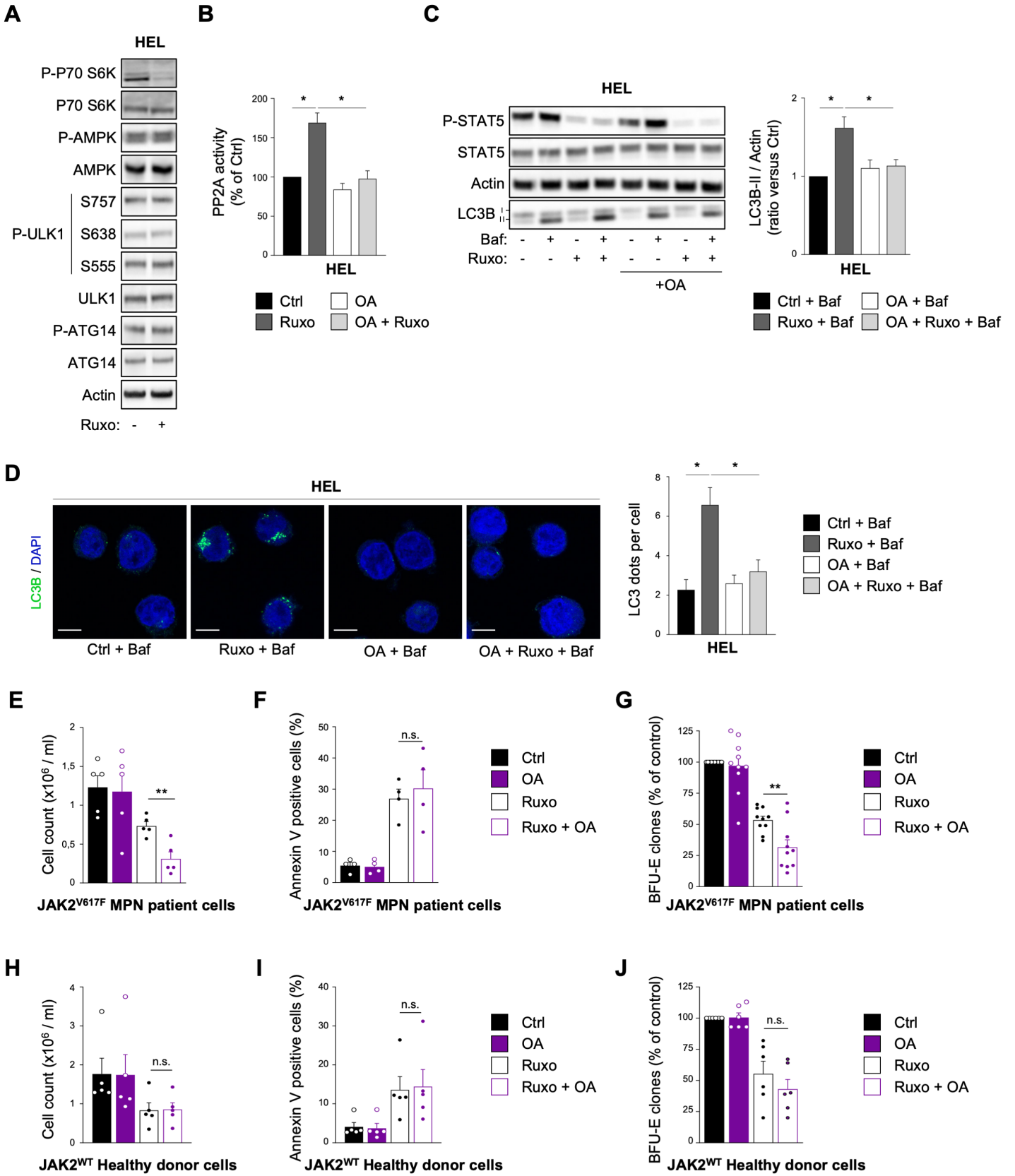
**Figure 1:**



**Figure 2:**

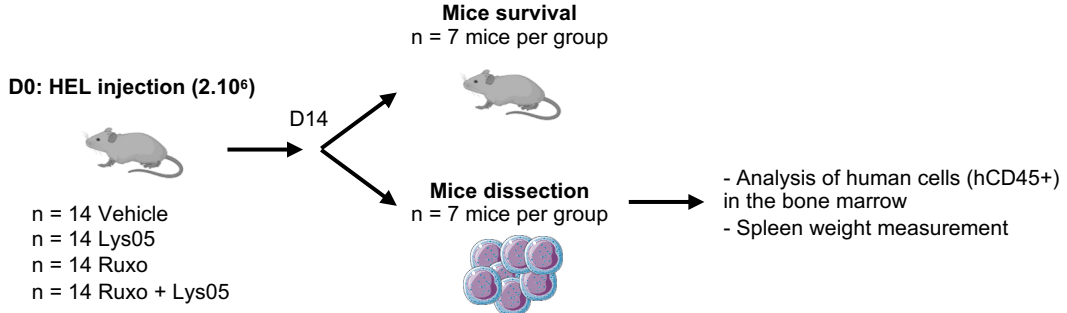


**Figure 3:**

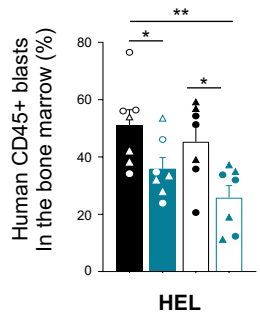


**Figure 4:**

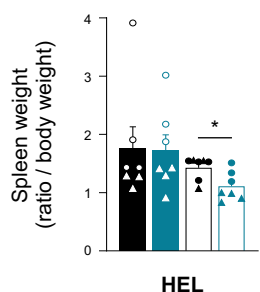
**A**



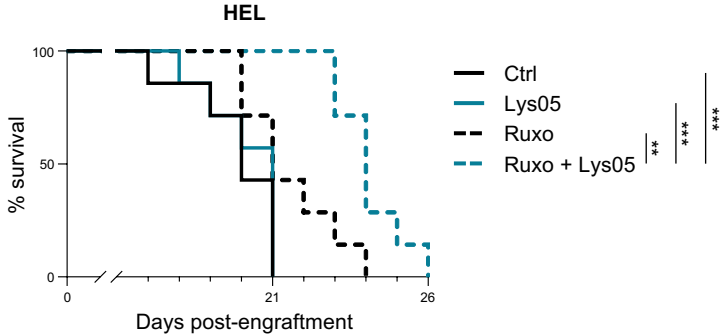
**B**



**C**



**D**



Ctrl
 Ruxo  
 Lys05
 Ruxo + Lys05



## **Supplementary Information**

### **Targeting PP2A-dependent autophagy enhances sensitivity to ruxolitinib in JAK2<sup>V617F</sup> myeloproliferative neoplasms**

**Courdy et al.**

#### **Table of Contents :**

- Supplementary Table 1**
- Supplementary Figures 1- 4**

	ID study	From	JAK2 <sup>V617F</sup> allelic burden at diagnosis	Follow-up treatment
JAK2 <sup>V617F</sup> -positive MPN patients	12	Toulouse University Hospital	"Intermediate"	Phlebotomy
	13		45%	Phlebotomy
	16		60%	Phlebotomy
	17		36%	Phlebotomy
	18		23%	Phlebotomy
	19		45%	Phlebotomy
	20		13%	Phlebotomy
	22		45%	Phlebotomy
	23		87%	Phlebotomy
	29		85%	Phlebotomy + pegylated interferon
	31		43%	Phlebotomy
	32		<10%	Phlebotomy
	33		27%	Phlebotomy
	34		10%	Phlebotomy
	35		39%	Phlebotomy
	36		>50%	Phlebotomy
	37		21%	Phlebotomy
	38		23%	Phlebotomy
	39		9%	Phlebotomy
	40		<10%	Phlebotomy
41	Not referred	Phlebotomy		
42	7%	Phlebotomy		
JAK2 <sup>WT</sup> healthy donors	A	EFS, Toulouse	None	None
	B		None	None
	C		None	None
	D		None	None
	E		None	None
	F		None	None

**Supplementary table 1.** Primary MPN patient and healthy donor characteristics.

**Figure S1. Ruxolitinib increases autophagy in JAK2<sup>V617F</sup> cells.** **A.** HEL cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) for 24 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) during 2 hours to monitor autophagy flux and processed for western blot analysis of LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3  $\pm$  s.e.m.). **B.** HEL cells were treated with fedratinib (1 $\mu$ M) or CHZ868 (500nM) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux and processed for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=3  $\pm$  s.e.m.).

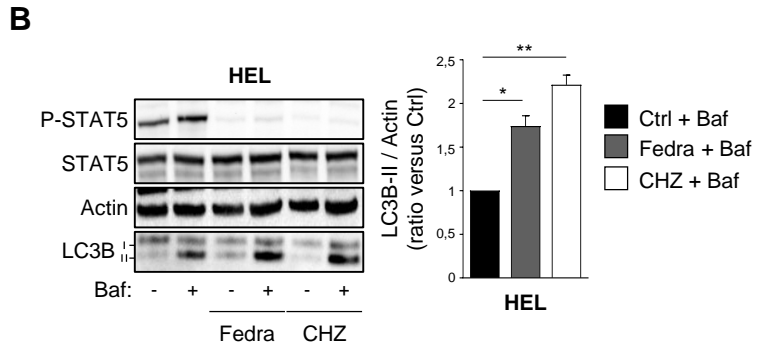
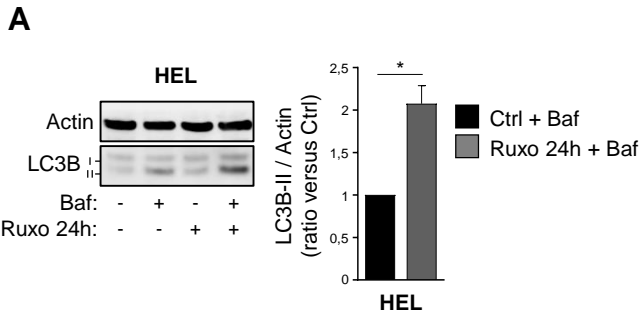
**Figure S2. Autophagy inhibition enhances ruxolitinib efficacy in JAK2<sup>V617F</sup> cells.** **A.** HEL cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) and SAR405 (3 $\mu$ M) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux and processed for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=2  $\pm$  s.e.m.). **B.** Representative picture of BFU-E clones after 14 days of CD34+ MPN patients' cells cultured in semi-solid medium supplemented or not with ruxolitinib (250nM) and chloroquine (3 $\mu$ M) or SAR405 (3 $\mu$ M). Scale bar: 300 $\mu$ m.

**Figure S3. PP2A inhibition enhances ruxolitinib efficacy in JAK2<sup>V617F</sup> cells.** **A-B.** SET-2 cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu$ M) and OA (5nM) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux. Cells were processed for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis (n=4  $\pm$  s.e.m.), **(A)**. Cells were stained for LC3B and analyzed by confocal microscopy. Graphs represent the number of LC3B dots per cell (n=4  $\pm$  s.e.m.), **(B)**. Scale bar: 10 $\mu$ m. **C-D.** SET-2 cells were treated with FTY720 (2.5 $\mu$ M) for 2 or 6 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux. Cells were processed for western blot analysis of LC3B. Actin was used as a

loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis ( $n=3 \pm \text{s.e.m.}$ ), (C). Cells were stained for LC3B and analyzed by confocal microscopy. Graphs represent the number of LC3B dots per cell ( $n=3 \pm \text{s.e.m.}$ ), (D). Scale bar: 10 $\mu\text{m}$ . E-F. HEL cells were treated with ruxolitinib (1 $\mu\text{M}$ ) and LB100 (2.5 $\mu\text{M}$ ) for 2 hours in the presence or absence of bafilomycin (25nM) to monitor autophagy flux. Cells were processed for western blot analysis of P-STAT5, STAT5 and LC3B. Actin was used as a loading control. Graphs represent the LC3B-II/actin ratios obtained by densitometric analysis ( $n=3 \pm \text{s.e.m.}$ ), (E). Cells were stained for LC3B and analyzed by confocal microscopy. Graphs represent the number of LC3B dots per cell ( $n=3 \pm \text{s.e.m.}$ ), (F). G. CD34+ cells from JAK2<sup>V617F</sup> MPN patient samples were plated for colony forming assay in semi-solid medium supplemented or not with ruxolitinib (250nM) and LB100 (1 $\mu\text{M}$ ). After 14 days, clonogenic potential was assessed by counting the number of BFU-E clones per dish. Data are represented as percent of control ( $n=4 \pm \text{s.e.m.}$ ).

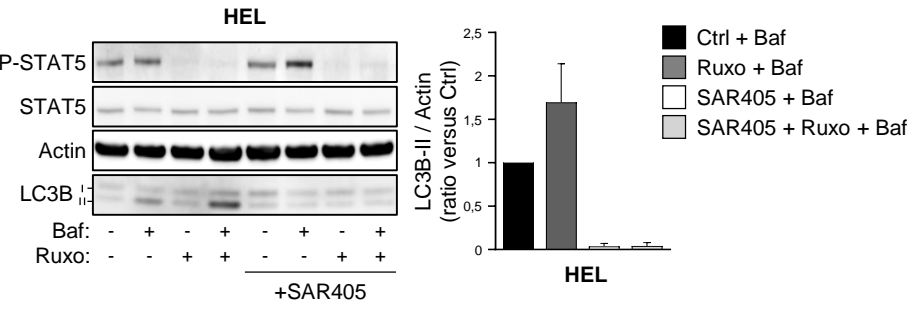
**Figure S4. Autophagy inhibitor Lys05 enhances ruxolitinib efficacy in JAK2<sup>V617F</sup> cells *in vitro* and *in vivo*.** A. HEL cells were treated or not with ruxolitinib (1 $\mu\text{M}$ ) in the presence or absence of Lys05 (5 $\mu\text{M}$ ). After 3 days, the number of cells was assessed by trypan blue exclusion counting (left panel;  $n=4 \pm \text{s.e.m.}$ ) and the percentage of cell death was determined by Annexin-V labelling and flow cytometry analysis (right panel;  $n=4 \pm \text{s.e.m.}$ ). B. CD34+ cells from JAK2<sup>V617F</sup> MPN patient samples were plated for colony forming assay in semi-solid medium supplemented or not with ruxolitinib (250nM) and Lys05 (1 $\mu\text{M}$ ). After 14 days, clonogenic potential was assessed by counting the number of BFU-E clones per dish. Data are represented as percent of control ( $n=4 \pm \text{s.e.m.}$ ). C. HEL cells were injected in NSG mice and, after 14 days of the indicated treatments their spleens were collected.

**Figure S1:**

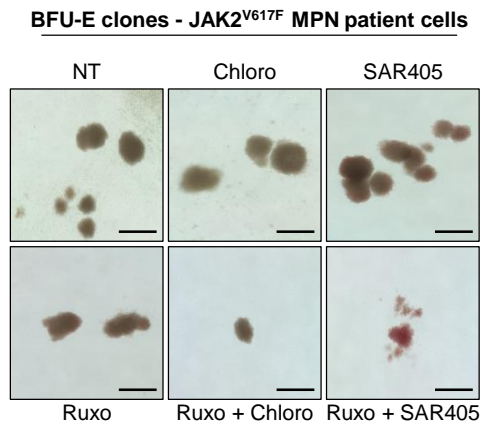


**Figure S2:**

**A**

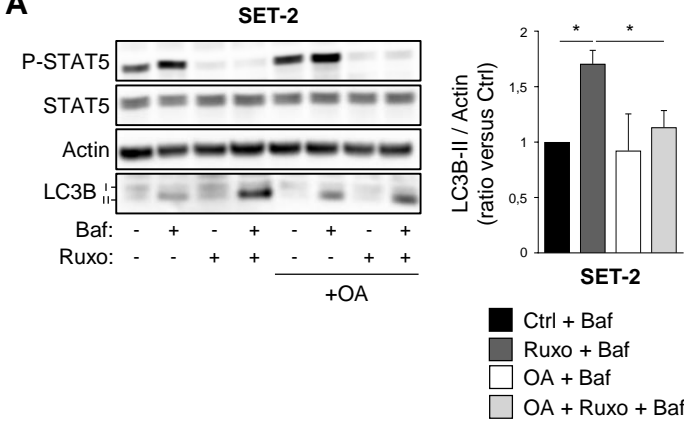


**B**

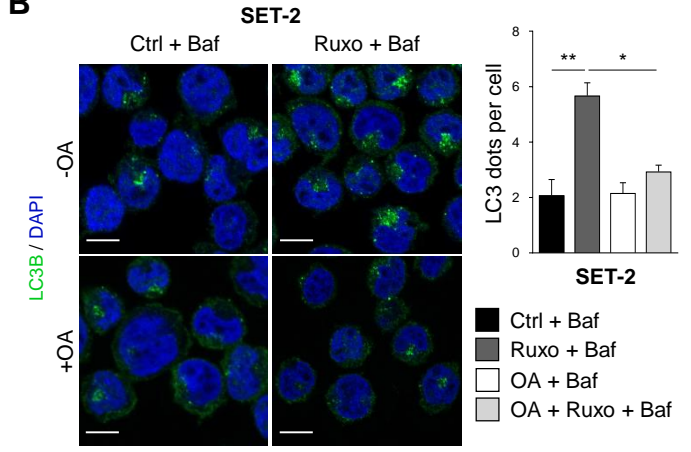


**Figure S3:**

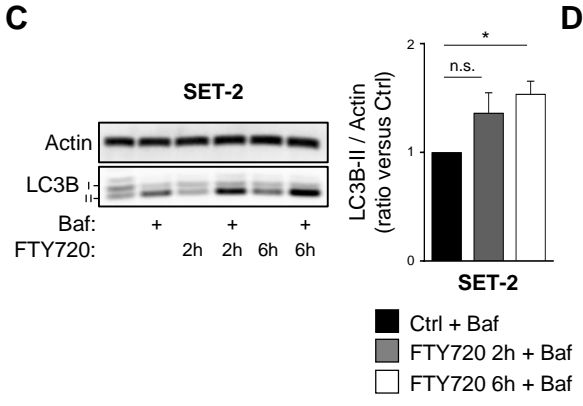
**A**



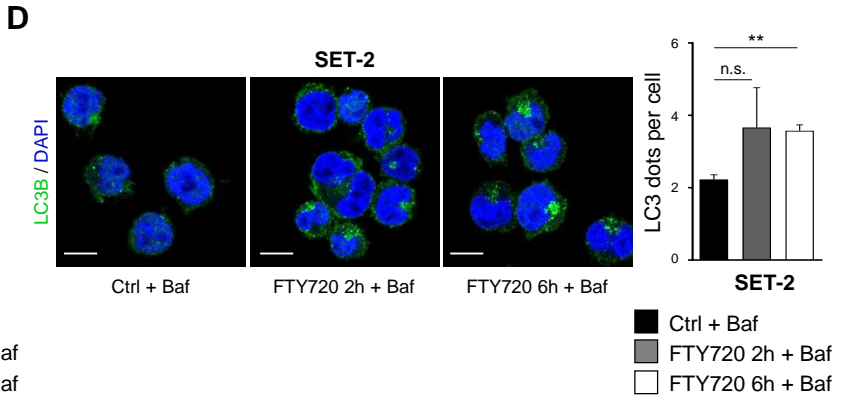
**B**



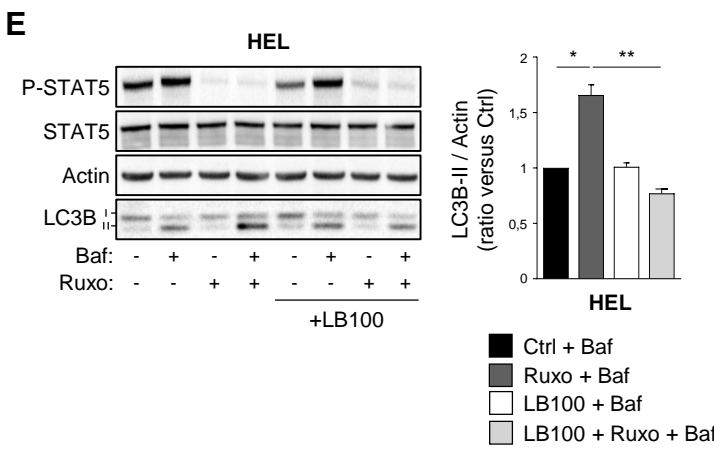
**C**



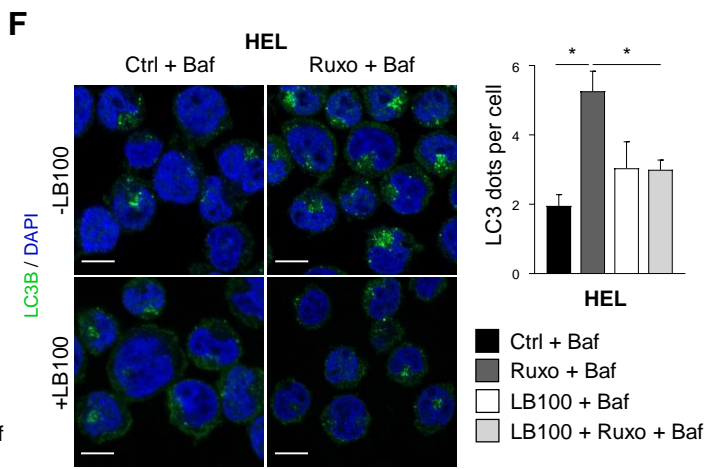
**D**



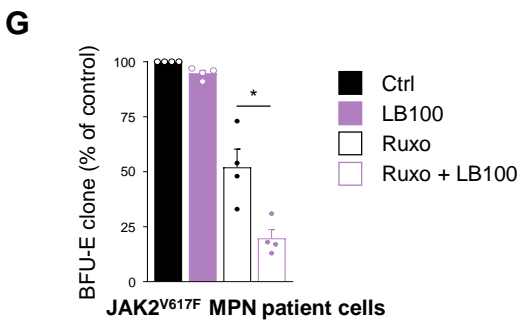
**E**



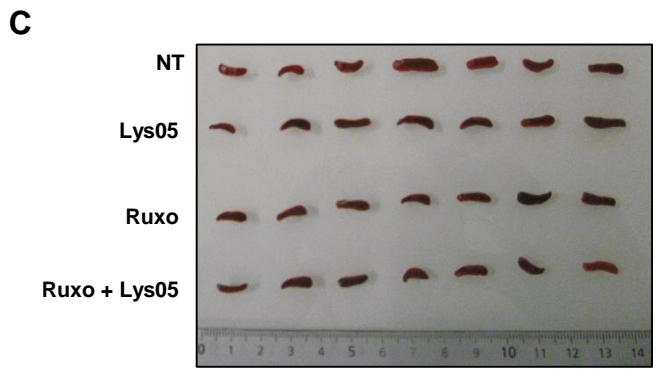
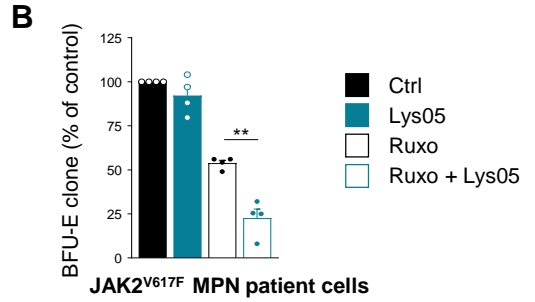
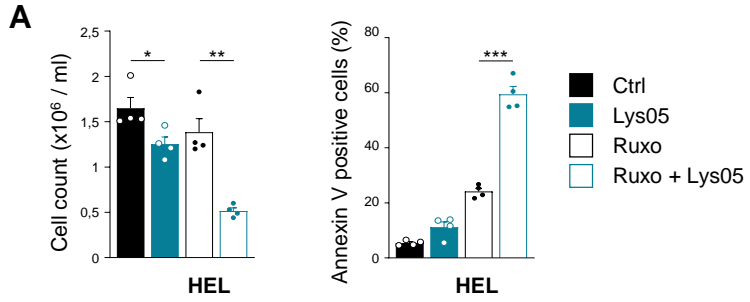
**F**



**G**



**Figure S4:**







# **DISCUSSION ET CONCLUSION**

## I. DISCUSSION :

Au cours de ma thèse, deux articles ont été publiés montrant que le ruxolitinib augmente l'autophagie dans une lignée cellulaire qui exprime JAK2<sup>V617F</sup> (Ishida et al., 2018; Machado-Neto et al., 2020). Ces deux travaux suggèrent qu'inhiber ce processus de dégradation augmente les effets cytotoxiques du ruxolitinib. Cependant, ces études n'ont pas évalué la contribution de l'autophagie dans la résistance au ruxolitinib dans des cellules de patients atteints de NMP ni évalué son rôle dans des modèles d'étude de la maladie *in vivo*. En outre, les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'induction de l'autophagie par le ruxolitinib restaient à ce jour inconnus.

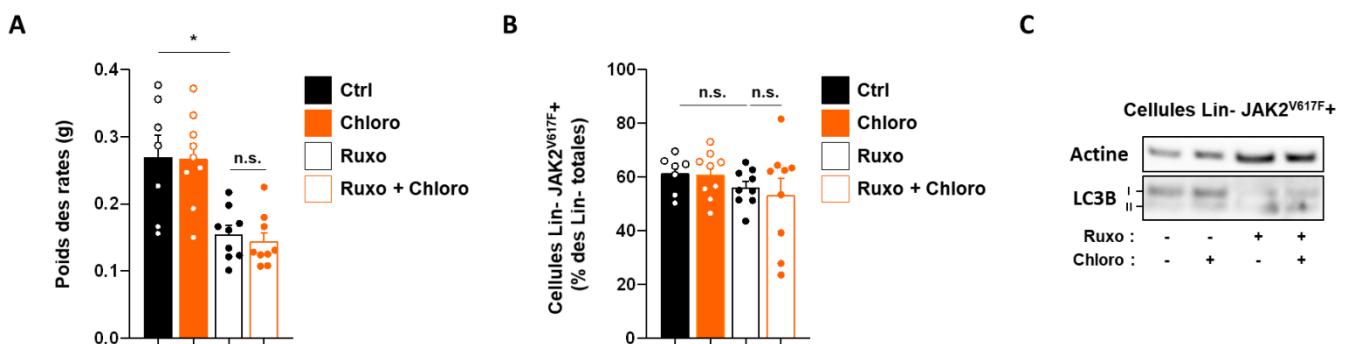
Mon travail de thèse permet une meilleure caractérisation du rôle cytoprotecteur de l'autophagie en réponse au ruxolitinib et ce à travers l'utilisation de deux lignées cellulaires mais également de cultures primaires de cellules de patients atteints de NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. En effet, les expériences que j'ai menées démontrent pour la première fois que l'inhibition de l'autophagie sensibilise des cellules de patients au ruxolitinib. En parallèle, en montrant l'implication de la phosphatase PP2A dans ce processus, mes travaux permettent une meilleure connaissance des bases moléculaires qui régulent l'autophagie dans ce contexte. Nous avons également confirmé *in vivo* dans une étude princeps l'implication de l'autophagie dans la résistance au ruxolitinib. Cette étude apporte donc un rationnel pour le développement d'un essai clinique visant à déterminer l'efficacité de l'association du ruxolitinib avec un inhibiteur de l'autophagie ou de PP2A chez des patients atteints de NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>.

Plusieurs questions restent cependant ouvertes pour compléter cette étude et posent également les bases du développement de nouveaux projets de recherches.

### A. Etudier *in vivo* le caractère cytoprotecteur de l'autophagie dans des modèles murins de NMP :

Au cours de ma thèse, j'ai évalué *in vivo* la relevance fonctionnelle d'une inhibition de l'autophagie, en combinaison avec le ruxolitinib, dans un modèle de xénogreffe de cellules qui expriment JAK2<sup>V617F</sup> dans des souris NSG. Dans ce modèle, le Lys05, un inhibiteur de l'autophagie de deuxième génération administré en combinaison avec le ruxolitinib, réduit la charge tumorale et prolonge significativement la survie des souris. Cette étude confirme ainsi *in vivo* le caractère cytoprotecteur de l'autophagie dans la réponse au ruxolitinib. Il était également intéressant d'étudier l'impact d'une inhibition de l'autophagie ou de son régulateur en amont PP2A dans la réponse au ruxolitinib dans un modèle murin de NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Dans un tel modèle syngénique, des cellules hématopoïétiques murines qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup> sont greffées en compétition avec des cellules saines dans des souris receveuses

préalablement irradiées. Ceci présente le double avantage de reproduire le phénotype d'une NMP humaine (myélopoïèse exacerbée, inflammation et splénomégalie) et de permettre de suivre *in vivo* l'évolution du clone malin au sein de l'hématopoïèse normale (Benlabiod et al., 2022). J'ai dans ce modèle réalisé une expérience pilote afin d'étudier l'impact de la combinaison du ruxolitinib avec la chloroquine, le seul inhibiteur de l'autophagie actuellement approuvé en clinique, sur le contrôle du clone malin qui porte la mutation JAK2<sup>V617F</sup> et sur la réduction de la splénomégalie des souris. En accord avec la littérature actuelle rapportant les effets modestes du ruxolitinib *in vivo* (Austin et al., 2020), ce traitement en monothérapie réduit la splénomégalie des souris mais n'a pas permis de contrôler la charge tumorale (Figure 37A-B). De plus, nos expériences ont révélé que l'autophagie n'était pas inhibée par la chloroquine dans les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse des souris (Figure 37C). Nous ne pouvons donc pas conclure quant à un rôle de l'autophagie dans la résistance au ruxolitinib dans ce modèle. Similairement, dans un modèle murin de LMC qui exprime l'oncogène BCR-ABL1, il a été montré que la chloroquine n'inhibait pas convenablement l'autophagie dans les cellules souches leucémiques situées dans la moelle osseuse (Baquero et al., 2019). En revanche, le Lys05 s'est révélé efficace pour inhiber l'autophagie *in vivo* dans ces cellules. Il serait donc intéressant d'évaluer l'impact d'un traitement au ruxolitinib en bithérapie avec un inhibiteur de l'autophagie efficace comme le Lys05, ou un inhibiteur de PP2A, sur le contrôle des signes de la maladie dans ce modèle.



**Figure 37 : Etude de la combinaison du ruxolitinib avec la chloroquine *in vivo* dans un modèle murin de NMP JAK2<sup>V617F</sup>.**

Des souris C57BL/6 préalablement irradiées ont été greffées avec un mélange de cellules hématopoïétiques qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup> et de cellules saines. Une fois le phénotype de NMP établi, les souris ont été traitées au ruxolitinib, en combinaison ou non avec la chloroquine. Après 8 semaines de traitement, les souris ont été disséquées pour évaluer l'impact des traitements sur (A) le poids des rates et (B) la charge tumorale dans les progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. (C) Les progéniteurs mutés ont ensuite été triés afin d'évaluer par western blot l'impact des traitements sur l'accumulation de la protéine LC3-II.

Le ruxolitinib entraîne une augmentation du flux autophagique *in vitro* dans des lignées cellulaires exprimant JAK2<sup>V617F</sup> et dans des cultures primaires de cellules de patients atteints de NMP qui portent cette mutation. Il serait également intéressant d'étudier *in vivo* l'impact de ce traitement sur l'autophagie. Pour cela, j'ai trié les cellules humaines JAK2-mutées à partir de moelles osseuses de souris xéno-greffées qui avaient été traitées au ruxolitinib en combinaison ou non avec le Lys05. Le marquage de la protéine LC3 pour mesurer l'autophagie

par microscopie à fluorescence sur ces cellules triées nécessite cependant d'être optimisé et n'a pas permis d'évaluer correctement les effets du ruxolitinib sur ce processus de dégradation. Pour pallier à cette limitation technique, nous pourrions tirer avantage des modèles murins de NMP et visualiser par diverses techniques (CytolD, suivi du marquage de la protéine LC3 par cytométrie en flux ou par imagerie en flux) l'impact du ruxolitinib sur l'autophagie dans les cellules qui portent la mutation  $JAK2^{V617F}$  et dans les cellules sauvages. Ce modèle permettra ainsi de déterminer *in vivo* si le ruxolitinib augmente l'autophagie et ce spécifiquement dans les cellules malignes. De la même manière, il serait possible de constituer une base de données cliniques des patients atteints de NMP et d'analyser au laboratoire de manière systématique le flux autophagique à partir de prélèvements de sang périphérique ou de moelle osseuse de patients par cytométrie en flux, imagerie en flux ou CytolD. Nous pourrions ainsi déterminer si des corrélations existent entre les niveaux d'autophagie chez les patients et la résistance au ruxolitinib en clinique.

## **B. Caractériser comment PP2A régule l'autophagie sous traitement au ruxolitinib :**

Nous démontrons que l'autophagie induite sous traitement au ruxolitinib est dépendante de la phosphatase PP2A. Les mécanismes moléculaires précis sont cependant toujours indéterminés. Dans la littérature, cette phosphatase a été impliquée dans le contrôle de l'autophagie à plusieurs niveaux. D'une part, PP2A réprime la signalisation PI3K/AKT en amont du complexe mTORC1 (Kim et al., 2009). Une activation de PP2A pourrait donc se traduire par une inhibition de la voie PI3K/AKT/mTORC1 et conduire à une activation de l'autophagie. D'autre part, l'autophagie est directement réprimée *via* la phosphorylation inhibitrice du complexe d'initiation ULK1 par mTORC1. PP2A régule directement ce complexe d'initiation en déphosphorylant des sites inhibiteurs sur les protéines ULK1 et ATG13 pour activer l'autophagie (Wong et al., 2015; Yeasmin et al., 2016). L'implication de PP2A dans la régulation spatio-temporelle de la protéase ATG4B pour permettre le bon déroulement du processus d'autophagie a également été documentée (Pengo et al., 2017). En effet, dans le cytosol, ATG4B sous sa forme active déphosphorylée clive le pré-LC3 néosynthétisé pour générer un réservoir cellulaire de LC3-I nécessaire au processus d'autophagie. En revanche, lorsque l'autophagie est activée, ATG4B est phosphorylé et inhibé par ULK1 à la membrane autophagosomes en cours d'expansion afin de favoriser l'ancrage sur ces vésicules du LC3 sous sa forme liée à une phosphatidyléthanolamine (LC3-II). Enfin, PP2A déphosphoryle ATG4B pour permettre sa réactivation et ainsi favoriser le recyclage du LC3-II en LC3-I à la membrane des autophagosomes formés en cours de maturation. A travers cette régulation séquentielle de ATG4B dans l'espace et dans le temps, PP2A représente un acteur majeur dans le contrôle de l'autophagie. Enfin, cette phosphatase peut également contrôler l'autophagie au niveau transcriptionnel. La déphosphorylation du facteur de transcription TFEB

par PP2A induit sa translocation dans le noyau où il pourra alors activer la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse des autophagosomes (Hasegawa et al., 2022; Martina and Puertollano, 2018).

Des expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer quelles protéines de l'autophagie sont régulées par PP2A dans le contexte des NMP JAK2<sup>V617F</sup> traitées au ruxolitinib. Pour cela, nous proposons d'identifier les partenaires co-immunoprécipités de PP2A par spectrométrie de masse dans des cellules qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup> en condition où l'autophagie est induite par le ruxolitinib. La recherche de protéines de l'autophagie au sein de l'interactome de PP2A nous permettra de déterminer à quel(s) niveau(x) cette phosphatase régule l'autophagie. Il serait également possible d'identifier des variations du statut de phosphorylation de protéines de l'autophagie dans des cellules de NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup> traitées au ruxolitinib en combinaison avec un inhibiteur de PP2A. Nous pourrions d'une part d'étudier directement la phosphorylation de protéines candidates (ULK1, ATG13, ATG4b, TFEB) par une technique de western blot précédée ou non d'une étape d'électrofocalisation en gel 2D qui permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire et de leur point isoélectrique qui dépend de leur statut de phosphorylation. D'autre part, nous pourrions déterminer le statut de phosphorylation de ces protéines candidates par la technique Phos-Tag. Cette approche consiste en l'ajout dans des extraits protéiques d'une sonde qui va affecter le profil de migration électrophorétique des protéines phosphorylées et permettre ainsi de visualiser leur statut de phosphorylation par western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les formes totales de ces protéines (Kinoshita et al., 2012). Enfin, cette étude pourrait être menée par une approche globale de phosphoprotéomique.

Par ailleurs, PP2A correspond à une famille de plus de deux cents complexes hétérotrimériques composés d'une sous-unité catalytique, d'une sous-unité structurale et de l'une des nombreuses sous-unités régulatrices. La sous-unité régulatrice contrôle l'activité de PP2A en déterminant sa spécificité de substrat ou de localisation. Il a été montré que JAK2 pouvait directement interagir avec PP2A pour l'inactiver (Yokoyama et al., 2001). Dans un modèle murin de cellules myéloïdes qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, il a été démontré que JAK2 réprimait PP2A par une voie de signalisation PI3K $\gamma$ /PKC/SET. De plus, réactiver PP2A de manière pharmacologique avec le FTY720 a montré une forte activité antileucémique *in vitro* et *in vivo* (Oaks et al., 2013). Ces données semblent opposées à nos résultats qui montrent que l'inhibition de PP2A sensibilise les cellules de NMP JAK2<sup>V617F</sup> au ruxolitinib. Plusieurs PP2A peuvent avoir des effets opposés dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>. La sous-unité régulatrice B56 $\alpha$  de PP2A réprime l'activité du JAK2 muté alors qu'une sous-unité régulatrice B56 $\gamma$  favorise l'activation de JAK2<sup>V617F</sup> (Kawashima and Kirito, 2016). Nous pouvons donc spéculer que des complexes PP2A différents sont activés par le FTY720 et par le ruxolitinib. De manière intéressante, nous montrons que le FTY720 augmente l'autophagie dans une lignée cellulaire qui exprime JAK2<sup>V617F</sup>. Ce résultat confirme notre hypothèse selon laquelle

PP2A est un régulateur positif de l'autophagie dans les NMP. Le rôle potentiel de l'autophagie induite par le FTY720 dans la réponse à ce traitement n'a cependant pas été étudié.

Il serait alors intéressant d'identifier la sous-unité régulatrice de PP2A responsable de l'induction de l'autophagie par le ruxolitinib. Pour cela, nous proposons de réaliser dans des cellules de NMP JAK2<sup>V617F</sup> un crible fonctionnel à l'aide d'une librairie de shARN dirigés contre les différentes sous-unités de cette phosphatase (Horizon Discovery #V3SH8353). L'identification des sous-unités régulatrices de PP2A dont la déplétion bloque l'autophagie induite par le ruxolitinib permettra une meilleure compréhension des bases moléculaires de ce processus.

De manière générale, le ciblage de sous-unités régulatrices spécifiques de PP2A pourrait permettre de moduler des processus cellulaires précis, comme l'autophagie, et représenterait une stratégie prometteuse pour développer des thérapies potentiellement non toxiques. Des études qui se sont inspirées de la capacité de protéines virales à interagir avec des sous-unités de PP2A ont ainsi conduit au développement de peptides à activité anti-tumorale dont le mécanisme d'action était dépendant du ciblage spécifique des sous-unités de cette phosphatase (Arrouss et al., 2013; Godet et al., 2011; Guergnon et al., 2006; Mitrus et al., 2005).

Ces résultats dans leur ensemble sont essentiels à la caractérisation des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'induction de l'autophagie par le ruxolitinib. Nous montrons que le ruxolitinib n'active pas l'autophagie dans des lignées cellulaires qui possèdent un JAK2 sauvage. Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie ou de PP2A n'a pas augmenté la sensibilité au ruxolitinib dans des cellules hématopoïétiques saines. Ceci suggère que l'induction d'une autophagie cytoprotectrice dépendante de PP2A est un mécanisme propre aux cellules cancéreuses de NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup>. L'identification de tels mécanismes permettra à terme de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques des cellules tumorales ce qui limitera les effets indésirables des inhibiteurs de JAK2.

En effet, l'une des principales limitations du ruxolitinib en clinique est qu'il cible également le JAK2 sauvage ce qui entraîne l'inhibition de l'hématopoïèse normale et engendre l'apparition de cytopénies parfois sévères pouvant causer une interruption du traitement. La technique de greffe en compétition dans les modèles murins de NMP permettrait de déterminer *in vivo* si la stratégie thérapeutique que nous proposons augmente la spécificité du traitement vis-à-vis du clone malin. De la même manière, les prélèvements de cellules de patients dont nous avons disposé au cours de cette étude sont constitués d'un ensemble hétérogène de cellules mutées pour JAK2 et de cellules possédant JAK2 sauvage. Nous avons montré à partir de ces prélèvements que la combinaison du ruxolitinib avec des inhibiteurs de l'autophagie réduit significativement la capacité clonogénique de progéniteurs hématopoïétiques issus de patients atteints de NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Dans ces expériences, la recherche de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> par génotypage sur des clones individualisés permettrait

de révéler *in vitro* dans des cellules de patients si les traitements appliqués impactent préférentiellement ou non les clones mutés.

## **C. Identifier comment l'autophagie participe aux mécanismes de résistance au ruxolitinib :**

Nous montrons que l'autophagie est impliquée dans la résistance thérapeutique au ruxolitinib dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Compte tenu de ces résultats, nous pouvons nous demander comment ce mécanisme de dégradation participe à la résistance au ruxolitinib.

### **1. Rôle de l'autophagie dans le métabolisme énergétique :**

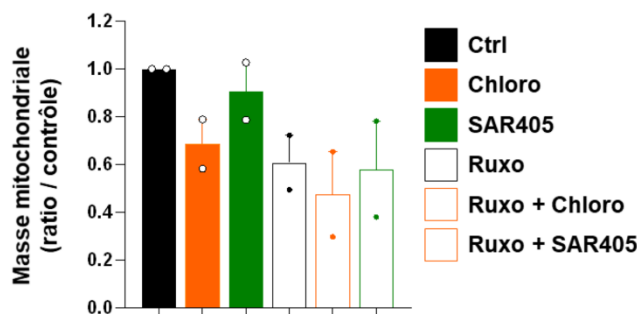
De par son rôle dans la dégradation de composants cellulaires, l'autophagie apporte différents substrats pour alimenter la glycolyse, la voie des pentoses phosphates ou le cycle de Krebs (Galluzzi et al., 2014; Rabinowitz and White, 2010). De plus, la dégradation sélective des mitochondries par mitophagie représente un mécanisme clé dans la régulation de la masse et de l'activité mitochondriale (Lemasters, 2005). L'autophagie représente donc un régulateur majeur du métabolisme énergétique.

Il a été montré que les cellules de NMP qui portent la mutation JAK2<sup>V617F</sup> présentent une glycolyse élevée qui supporte la forte prolifération des cellules (Reddy et al., 2012). De la même manière, la respiration mitochondriale est augmentée dans les cellules mutées. Elle est notamment soutenue dans ces cellules par le métabolisme de la glutamine et des acides aminés ramifiés (Gu et al., 2019; Hattori et al., 2017; Zhan et al., 2015). Interférer avec ce métabolisme exacerbé réduit la prolifération et la survie cellulaire dans les NMP. Cependant, le ruxolitinib semble peu affecter la respiration mitochondriale (Rao et al., 2019). Ceci suggère la mise en place de mécanismes alternatifs qui maintiennent ces voies métaboliques actives sous traitement au ruxolitinib et permettent aux cellules de résister. L'autophagie constitue alors un candidat d'intérêt dans le contrôle de ces voies métaboliques sous traitement. Des travaux récents de mon équipe d'accueil dans des cellules de LAM mettent en évidence que la mitochondrie régule le flux autophagique pour ajuster ses apports en lipides alimentant le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale (Bosc et al., 2020). La metformine, un inhibiteur de la respiration mitochondriale, inhibe ainsi également le processus d'autophagie dans les cellules de LAM. Dans des lignées cellulaires qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, cet inhibiteur augmente l'efficacité du ruxolitinib similairement aux inhibiteurs de l'autophagie (Kawashima and Kirito, 2016; Machado-Neto et al., 2018), suggérant l'existence potentielle de liens entre l'autophagie et le métabolisme énergétique des NMP. Une hypothèse envisageable serait donc que l'autophagie induite par le ruxolitinib contrecarre les effets du traitement en maintenant un métabolisme énergétique élevé qui participe à la survie des cellules.



Pour répondre à cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'impact d'une inhibition de JAK2 par le ruxolitinib, en combinaison avec des inhibiteurs de l'autophagie, sur la masse et la fonction mitochondriale (respiration mitochondriale, production d'ATP, consommation de glucose, production de lactate par oxygraphie Seahorse). Une étude des flux métaboliques pourrait également être réalisée. Cette approche, basée sur un marquage isotopique des nutriments, permet de déterminer par spectrométrie de masse l'activité des différentes voies métaboliques et la contribution de ces voies dans la production de divers métabolites. Ces expériences pourront être menées dans des lignées cellulaires et des cellules de patients JAK2 mutés mais également *ex vivo* dans des modèles murins de NMP.

Les premières expériences que j'ai menées montrent que le ruxolitinib tend à diminuer la masse mitochondriale dans une lignée cellulaire qui exprime JAK2<sup>V617F</sup> (Figure 38). Ce résultat semble indiquer que l'augmentation de l'autophagie par le ruxolitinib régule le métabolisme énergétique en augmentant la dégradation des mitochondries par mitophagie. Cependant, la diminution de la masse mitochondriale est toujours observée lorsque l'autophagie est inhibée pharmacologiquement avec la chloroquine ou le SAR405 (Figure 38). Le contrôle de la masse mitochondriale sous inhibition de JAK2 par le ruxolitinib semble donc indépendant du processus de mitophagie. Des expériences complémentaires sont cependant nécessaires pour évaluer le rôle de l'autophagie induite par le ruxolitinib dans le contrôle du métabolisme énergétique.



**Figure 38 : Etude de l'impact de l'inhibition de JAK2<sup>V617F</sup> par le ruxolitinib, en combinaison ou non avec une inhibition de l'autophagie, sur la masse mitochondriale.**

Des cellules HEL ont été traitées pendant 24h par le ruxolitinib (1 $\mu$ M) en combinaison ou non avec la chloroquine (20 $\mu$ M) ou le SAR405 (3 $\mu$ M) puis la masse mitochondriale a été déterminée par cytométrie en flux à l'aide de la sonde Mitotracker Green (n=2).

## 2. Rôle de l'autophagie dans le maintien des CSH :

Dans les modèles murins de NMP JAK2<sup>V617F</sup>, il a été montré que les CSH initiatrices de la maladie étaient résistantes au ruxolitinib (Austin et al., 2020). Le développement de stratégies thérapeutiques qui ciblent les CSH permettrait donc d'améliorer l'efficacité du ruxolitinib. C'est ce qui a été proposé avec l'IFN $\alpha$  qui active le cycle cellulaire, augmente le taux de ROS et accumule des dommages à l'ADN dans les CSH JAK2<sup>V617F</sup>. Cette drogue conduit alors à l'épuisement des CSH et permet, en combinaison avec le ruxolitinib, d'améliorer la réponse cellulaire au traitement *in vivo* dans des modèles murins de NMP (Austin et al., 2020). Dans

la LMC, une autre NMP caractérisée par la présence de l'oncogène BCR-ABL1, le rôle de l'autophagie dans la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant cet oncogène est connu de longue date (Bellodi et al., 2009). Il a été montré dans ce modèle que les CSH leucémiques étaient résistantes à l'inhibition de cet oncogène (Kuntz et al., 2017). De manière intéressante, les CSH de LMC présentent un niveau d'autophagie élevé et l'utilisation du Lys05, un inhibiteur de l'autophagie de deuxième génération, promeut la sortie de quiescence et l'exhaustion de ces cellules initiatrices de la maladie (Baquero et al., 2019). Il a été montré dans ce même modèle qu'en réponse à une inhibition de l'autophagie, les CSH présentent une glycolyse inhibée, une augmentation de l'activité des mitochondries et une élévation des taux de ROS. La production accrue de ROS dans les CSH de LMC conduit à leur sortie de quiescence et à leur entrée en différenciation, ce qui les sensibilise à l'inhibition de BCR-ABL1 (Ianniciello et al., 2021; Karvela et al., 2016). L'ensemble de ces données indique que, dans la LMC, les CSH initiatrices de la maladie présentent une autophagie basale élevée qui réprime la production de ROS et favorise le maintien en quiescence de ces cellules résistantes aux inhibiteurs de tyrosine kinase.

De la même manière, il serait intéressant de déterminer si l'autophagie participe au maintien des CSH résistantes au ruxolitinib dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>. Pour cela, nous proposons de développer un projet qui serait mené à la fois *in vitro* dans des cultures primaires de cellules de patients et *in vivo* dans des modèles murins de NMP. Ces modèles d'études complémentaires permettent en effet d'étudier à l'aide de marquages immunophénotypiques l'ensemble des compartiments de la myélopoïèse maligne. Il serait ainsi possible de caractériser le statut autophagique des CSH par cytométrie en flux (marquage de la protéine LC3, CytoID). De plus, nous pourrions étudier l'impact d'une inhibition de l'autophagie sur le métabolisme énergétique des CSH (taux de ROS, masse mitochondriale, respiration mitochondriale, production d'ATP, consommation de glucose, production de lactate) mais également sur la quiescence (mesure du cycle cellulaire par cytométrie en flux) et les capacités d'auto-renouvellement de ces cellules (test de dilution limite *ex vivo*, transplantations secondaires *in vivo*).

L'ensemble de ces résultats permettrait de déterminer si dans les NMP exprimant JAK2<sup>V617F</sup> la résistance au ruxolitinib dépend des capacités de l'autophagie à maintenir un compartiment de CSH quiescentes et résistantes aux inhibiteurs de JAK.

### 3. Rôle de l'autophagie dans la régulation de signaux de mort :

La voie intrinsèque de mort cellulaire par apoptose est initiée par la présence de mitochondries perméabilisées qui ont perdu leur potentiel de membrane mitochondrial. En dégradant ces organites, l'autophagie participe à l'élimination de signaux pro-apoptotiques (Rodriguez-Enriquez et al., 2006). Il a été montré dans une lignée cellulaire humaine exprimant JAK2<sup>V617F</sup> qu'un traitement au ruxolitinib entraîne une augmentation du pourcentage de

mitochondries perméabilisées dans les cellules (Machado-Neto et al., 2020). Dans ce contexte, l'ajout d'un inhibiteur de l'autophagie augmente significativement le pourcentage de cellules qui présentent des mitochondries altérées. L'autophagie induite par le ruxolitinib pourrait donc potentiellement être impliquée dans l'élimination de ces signaux de mort et permettre aux cellules de survivre. Des expériences complémentaires sont cependant requises pour confirmer cette hypothèse.

Nous pourrions étudier, dans des cellules exprimant JAK2<sup>V617F</sup>, si un traitement au ruxolitinib augmente la dégradation des mitochondries par autophagie. Pour cela, il serait possible d'une part d'étudier la colocalisation de protéines mitochondriales avec des protéines de l'autophagie par microscopie à fluorescence (colocalisation LC3-TOMM20 ou « Proximity Ligation Assay ») mais également l'adressage des mitochondries dans les autophagolysosomes à l'aide de la sonde mt-Keima. Cette sonde, qui s'accumule dans la matrice mitochondriale, présente un changement de propriétés de fluorescence en fonction de l'acidité des compartiments dans lesquels elle se trouve. Elle permet ainsi d'évaluer la relocalisation des mitochondries du cytoplasme à pH neutre vers les lysosomes à pH acide au cours d'une activation du processus de mitophagie (Sun et al., 2017). D'autre part, nous proposons d'étudier par microscopie électronique la morphologie des autophagosomes et plus particulièrement la présence de mitochondries dans la lumière de ces vésicules sous traitement au ruxolitinib dans des cellules de NMP. Enfin, il serait intéressant de déterminer si le ruxolitinib entraîne une accumulation au niveau des autophagosomes de protéines mitochondriales (TOMM20, CoxIV) mais également de protéines impliquées dans la signalisation pro-apoptotique (Bad, Bax, Bid). Ces résultats pourront être visualisés par western blot ou par spectrométrie de masse à partir d'autophagosomes purifiés, technique à laquelle j'ai contribué au développement au sein du laboratoire (voir discussion partie E).

Ces expériences sont nécessaires à une meilleure caractérisation du rôle de l'autophagie dans la résistance des cellules aux signaux de mort cellulaire induits par le ruxolitinib.

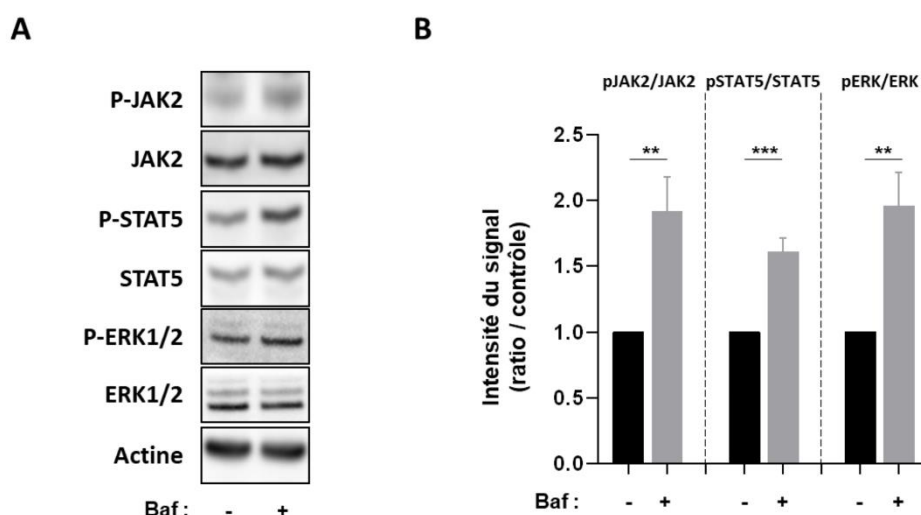
#### 4. Rôle de l'autophagie dans la signalisation oncogénique

Dans d'autres hémopathies malignes, la présence d'oncogènes, comme BCR-ABL1 dans la LMC ou FLT3-ITD et KIT<sup>D816V</sup> dans les LAM, active une autophagie pro-tumorale soutenant la prolifération des cellules (Colecchia et al., 2015; Dupont et al., 2022; Heydt et al., 2018; Larrue et al., 2019). Inhiber ce processus de dégradation permet alors de limiter la croissance tumorale dans ces pathologies. Nos travaux démontrent que l'autophagie est régulée en aval d'une inhibition de l'oncogène JAK2<sup>V617F</sup> dans les NMP. Cependant l'impact de la présence de la mutation de JAK2 sur ce processus catabolique n'a pas été étudié. Il serait donc intéressant de déterminer dans des lignées cellulaires de même fond génétique (cellules murines FDC-P1 qui expriment les complexes EPO-R/JAK2<sup>WT</sup> ou EPO-R/JAK2<sup>V617F</sup>) si l'introduction de la mutation V617F de JAK2 affecte le flux autophagique.

Comme discuté précédemment, l'autophagie pourrait contribuer dans ces pathologies à un bon fonctionnement du métabolisme énergétique pour soutenir la prolifération des cellules mais aussi limiter le stress oxydant et favoriser le maintien des CSH initiatrices de la maladie. Il apparaît également que ce processus catabolique pourrait participer à la régulation de voies de signalisation oncogéniques. En effet, l'autophagie, ou plus précisément l'autophagosome, peut réguler de manière sélective la signalisation de certaines protéines. Deux mécanismes de régulation sont décrits : d'une part la séquestration de la protéine dans l'autophagosome, ce qui conduit à sa dégradation. Et d'autre part, une littérature émergente montre que la protéine peut être recrutée à la surface de l'autophagosome qui sert alors de plateforme pour initier ou maintenir des cascades de signalisation. Si la localisation en partie aux autophagosomes de BCR-ABL1 a été décrite dans la LMC comme étant responsable de l'initiation d'une cascade de signalisation oncogénique (Colecchia et al., 2015), celle de JAK2<sup>V617F</sup> n'a qu'en partie été suggérée dans les NMP (Cleyrat et al., 2014).

L'un des mécanismes de résistance au ruxolitinib les mieux documentés est la réactivation sous traitement de voies de signalisation dépendantes des kinases JAK (Meyer, 2017). Cette réactivation dépend d'une formation réversible d'hétérodimères entre JAK2 et d'autres kinases JAK (Koppikar et al., 2012). Dans le but de palier à ces processus de réactivation, la caractérisation du rôle de l'autophagie dans la signalisation oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup> pourrait permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer le ciblage des cellules tumorales.

Au cours de cette étude, nous avons observé de manière hautement reproductible que l'inhibition des étapes tardives de l'autophagie par la bafilomycine entraînait une accumulation des formes phosphorylées des protéines JAK2, STAT5 et ERK1/2 sans pour autant modifier l'expression des formes totales de ces protéines (Figure 39A-B). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que JAK2<sup>V617F</sup> serait régulé par autophagie. Pour répondre à cette question, nous pourrions étudier dans un premier temps la localisation intracellulaire de JAK2 par des techniques classiques d'immunofluorescence et sa potentielle colocalisation avec des protéines de l'autophagie notamment par « Proximity Ligation Assay ». Puis, par microscopie électronique, nous pourrions étudier sa localisation exacte afin de déterminer si JAK2 est à l'intérieur ou à la surface des autophagosomes. Afin de comprendre comment l'autophagosome régule JAK2, par dégradation ou par contrôle de son activité, il serait possible d'analyser l'impact de la modulation de l'autophagie sur l'expression et/ou l'activation de JAK2, ceci à l'aide d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques de l'autophagie. Enfin, nous pourrions étudier la présence potentielle de protéines impliquées dans la signalisation de JAK2<sup>V617F</sup> au niveau des autophagosomes par une technique de purification de ces organelles (voir discussion partie E). L'ensemble de ces expériences, menées en présence ou non d'un traitement au ruxolitinib, permettra de déterminer si l'autophagie participe à la résistance au ruxolitinib en modulant la signalisation oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup>.



**Figure 39 : Etude de l'impact d'une inhibition de l'autophagie sur la signalisation oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup>.**

Les cellules HEL ont été traitées pendant 2 heures à la bafilomycine A1 (25nM) pour entraîner une accumulation des autophagosomes puis lysées. (A) Les niveaux d'expression et de phosphorylation des protéines indiquées ont été visualisés par western blot. (B) Les rapports des formes phosphorylées sur les formes totales des protéines JAK2, STAT5 et ERK1/2 ont été représentés (n=10).

## 5. Rôle de l'autophagie dans l'inflammation

La présence de JAK2<sup>V617F</sup> est associée à un état d'inflammation chronique, caractérisée notamment par des taux élevés d'IL-6, qui favorise l'expansion du clone malin et aggrave les symptômes de la maladie chez les patients (Hermouet et al., 2015). L'inhibition de cette inflammation à l'aide d'agents immunomodulateurs est actuellement évaluée dans des essais cliniques en combinaison avec le ruxolitinib (Loscocco and Vannucchi, 2022). Plusieurs études établissent un lien étroit entre autophagie et inflammation dans les cancers (Poillet-Perez et al., 2021). En effet, l'autophagie peut notamment supporter par divers mécanismes la production de cytokines pro-inflammatoires pour favoriser la croissance des tumeurs. Par exemple, dans un modèle de cellules épithéliales transformées par l'expression de l'oncogène RAS, l'autophagie a été impliquée dans la production de l'IL-6, une cytokine qui favorise des processus d'invasion et de métastase (Lock et al., 2014). Dans les NMP qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, il serait intéressant de déterminer si l'autophagie est impliquée dans la mise en place de ce phénotype d'inflammation chronique. Nous proposons pour cela d'étudier *in vitro* dans des lignées cellulaires et des cultures primaires de cellules de patients qui expriment JAK2<sup>V617F</sup> ainsi que *in vivo* dans des modèles murins de NMP si l'inhibition de l'autophagie affecte la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 par une technique de « multiplex cytokine profiling ». Ainsi, nous pourrions déterminer si l'inhibition de l'autophagie augmente la sensibilité au ruxolitinib en bloquant cette inflammation chronique. Si tel est le cas, nous pourrions réaliser des expériences de complémentation en déterminant si un

traitement avec ces mêmes cytokines contrecarre les effets d'une inhibition de l'autophagie sur la sensibilité au ruxolitinib.

## **D. Déterminer le rôle de l'autophagie dans le développement des NMP :**

### **1. Rôle de l'autophagie dans l'initiation de la maladie**

Récemment, des études *in silico* menées à partir de données de transcriptomique et de génomique de cellules de patients atteints de NMP JAK2<sup>V617F</sup> sont arrivées à la conclusion que la première CSH mutée apparaissait plusieurs décennies avant le diagnostic de la maladie (Van Egeren et al., 2021; Williams et al., 2022). Ces résultats sont en accord avec les données obtenues dans des modèles murins de NMP où la transplantation d'une seule CSH porteuse de la mutation JAK2<sup>V617F</sup> est suffisante pour induire un phénotype de NMP (Lundberg et al., 2014). Ceci suggère cependant l'existence de mécanismes qui favorisent la survie de cette CSH et sa progression lente vers un phénotype de NMP. Il serait intéressant de déterminer si l'autophagie participe aux étapes précoces de développement du clone initial dans ces maladies. Ce processus de dégradation pourrait être impliqué dans le maintien et l'évolution du clone initial de par son rôle dans le contrôle du métabolisme énergétique et du stress oxydant (Ianniciello et al., 2021). L'autophagie pourrait également dégrader les molécules du CMH de classe I pour favoriser l'échappement immunitaire des CSH cancéreuses (Yamamoto et al., 2020) ou encore favoriser la production de facteurs circulants comme les cytokines qui contribuent à l'expansion des cellules tumorales (Lock et al., 2014). Pour étudier l'implication de l'autophagie dans l'initiation de la maladie, il serait intéressant de réaliser *in vivo* des expériences de transplantation en dilution limite de CSH mutées dans des souris receveuses traitées ou non avec des inhibiteurs de l'autophagie. Nous pourrions ainsi déterminer si le blocage de l'autophagie affecte la capacité de reconstitution de l'hématopoïèse des CSH cancéreuses et impacte le délai de développement d'une NMP.

### **2. Rôle de l'autophagie dans l'évolution de la maladie**

La prise en charge des patients atteints de NMP représente un enjeu majeur en clinique. L'étude du rôle de l'autophagie dans ces pathologies permettrait de mieux appréhender les mécanismes biologiques qui soutiennent l'expansion du clone malin et pourrait permettre de limiter la survenue d'événements graves comme la transformation leucémique. L'autophagie protège les cellules saines de la transformation tumorale. À l'inverse, elle promeut la progression de tumeurs établies (Galluzzi et al., 2015; Joffre et al., 2021). Au cours de cette étude, j'ai établi que l'autophagie possède un rôle pro-tumoral dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>.

Cependant, sa contribution dans la progression de la maladie et son évolution en LAM ou en myélofibrose n'a jamais été étudié.

Les modèles murins de NMP JAK2<sup>V617F</sup> peuvent développer, si la maladie est suffisamment prolongée, une myélofibrose secondaire à une PV ou TE initiale. Afin de déterminer si l'autophagie est impliquée dans l'évolution des NMP, nous pourrions tout d'abord déterminer si l'autophagie est modulée en fonction du stade de la maladie en évaluant, à différentes étapes de la maladie, à partir de prélèvements de cellules de moelle osseuse des souris, les niveaux d'autophagie. De plus, ces modèles permettront de visualiser si l'inhibition de l'autophagie affecte la chronologie d'évolution de la maladie en myélofibrose.

Il serait également possible d'étudier des corrélations entre les niveaux d'autophagie chez les patients et l'évolution de la maladie à partir d'une banque de cellules de patients atteints de NMP collectées chez des patients présentant une PV, une TE ou une MFP et chez des patients où la maladie a évolué en myélofibrose ou en leucémie.

## **E. Etude de l'autophagie dans la biologie des hémopathies malignes :**

Plus généralement, l'autophagie est impliquée dans la résistance thérapeutique des hémopathies malignes (Auberger and Puissant, 2017; Joffre et al., 2021). C'est notamment le cas d'inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib et le crizotinib qui induisent une autophagie cytoprotectrice respectivement dans la LMC (Bellodi et al., 2009) et les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (Mitou et al., 2015). De plus, l'autophagie est également impliquée en aval de l'expression d'oncogènes dans la survie et la prolifération des cellules tumorales dans diverses hémopathies malignes (Colecchia et al., 2015; Dupont et al., 2022; Heydt et al., 2018; Larrue et al., 2019). Nos résultats viennent donc compléter une littérature existante selon laquelle l'autophagie est une cible thérapeutique à inhiber dans les hémopathies malignes.

Afin de déterminer de manière qualitative le rôle de l'autophagie dans la biologie de ces cancers du sang, il serait intéressant de déterminer le contenu des autophagosomes en fonction de l'expression d'oncogènes ou de divers traitements. En ce sens, pendant ma thèse, je me suis attaché à développer un protocole de purification des autophagosomes à partir de cellules leucémiques. Ce protocole a initialement été développé dans des hépatocytes de rat (Seglen and Brinchmann, 2010; Strømhaug et al., 1998). Il consiste en une première étape d'inhibition du flux autophagique avec la bafilomycine ou la chloroquine pour accumuler des autophagosomes. Par la suite, les cellules sont exposées à une pression augmentée en azote dans une chambre à cavitation, ceci permet une lyse mécanique des membranes plasmiques tout en conservant l'intégrité des organelles. La séparation des organelles se fait par une première étape de centrifugation différentielle pour éliminer les cellules intactes et les noyaux

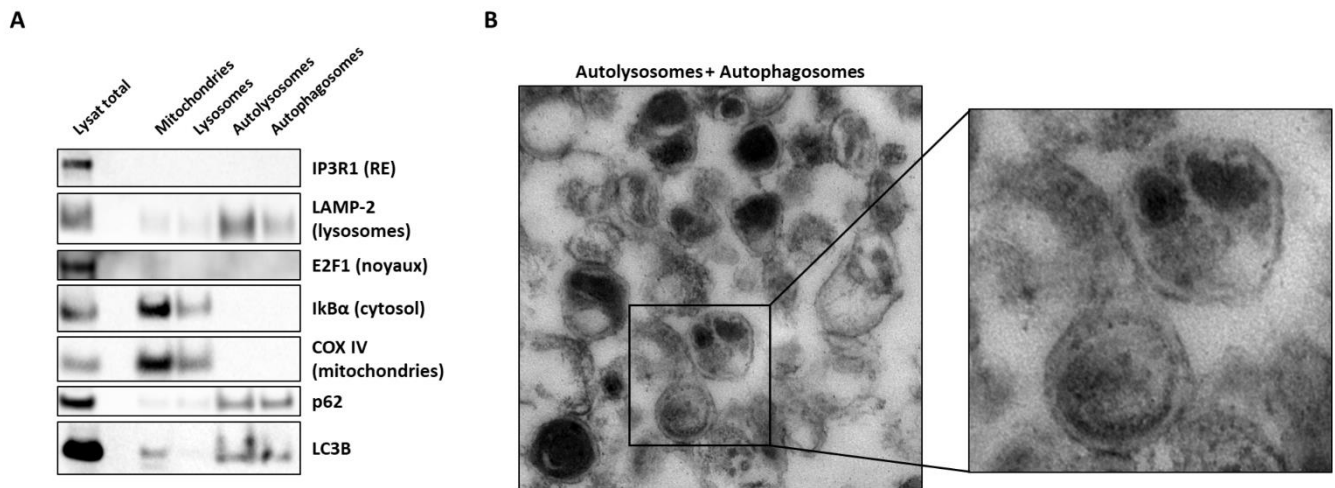
puis par une seconde étape d'ultracentrifugation de la fraction post-nucléaire sur un gradient discontinu de Nycodenz. Ce protocole permet ainsi de collecter dans différentes fractions les autophagosomes et autolysosomes, les lysosomes et les mitochondries.

Nous avons mis au point cette technique dans des cellules de LAM MOLM-14 qui portent la mutation FLT3-ITD, une mutation de mauvais pronostic retrouvée dans environ 25% des patients. Dans ces cellules, il a été montré que l'expression de FLT3-ITD induisait une augmentation de l'autophagie qui soutient la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Heydt et al., 2018). Dans un premier temps, il était nécessaire de valider ce protocole en visualisant par western blot l'enrichissement de marqueurs des organelles dans les différentes fractions collectées (Figure 40A). Ainsi, nous avons observé que la fraction autophagosomale présentait un bon enrichissement en protéines de l'autophagie comme LC3-II ou p62 tout en présentant un contenu réduit en protéines du noyau (E2F1), du RE (IP3R1), de la mitochondrie (CoxIV), des lysosomes (LAMP-2) ou du cytosol (I $\kappa$ B $\alpha$ ). Nous avons ensuite cherché à caractériser morphologiquement le contenu de notre fraction d'intérêt par microscopie électronique à transmission (Figure 40B). Par cette approche, nous avons pu observer que cette fraction présentait un enrichissement en vésicules à double membrane, qui correspondent à des autophagosomes. En conclusion, ce protocole, qui nécessite néanmoins encore d'être optimisé, permet l'enrichissement en autophagosomes à partir de lysats de cellules MOLM-14. Il permettra ainsi à mon équipe de caractériser qualitativement l'autophagie dans les hémopathies malignes.

Nous proposons maintenant de déterminer l'impact de l'expression de FLT3-ITD et de son inhibition pharmacologique sur le contenu des autophagosomes en purifiant ces organelles dans des lignées cellulaires qui expriment FLT3 sauvage ou FLT3-ITD muté en présence ou non d'inhibiteurs de cet oncogène. Une analyse globale par spectrométrie de masse permettra une identification des protéines localisées à l'autophagosome en fonction de l'expression et de l'activité de FLT3-ITD. Dans le but de déterminer avec précision le rôle de l'autophagie dans la régulation des protéines identifiées, nous proposons d'étudier leur localisation exacte, à l'intérieur des autophagosomes pour être dégradées ou à leur surface pour exercer leur fonction, à l'aide de tests de protection à la protéinase K. Ces approches nous permettraient ainsi de déterminer comment l'autophagie participe à la biologie des LAM qui expriment FLT3-ITD.

A terme cette méthode pourra être menée dans d'autres hémopathies malignes en fonction de l'expression d'oncogènes et de divers traitements comme par exemple un traitement au ruxolitinib dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Ceci permettrait de déterminer si l'autophagie participe au contrôle de cascades de signalisation oncogéniques, à la régulation de protéines impliquées dans des processus comme le métabolisme énergétique, le stress oxydant, l'apoptose ou l'inflammation (voir discussion partie C).





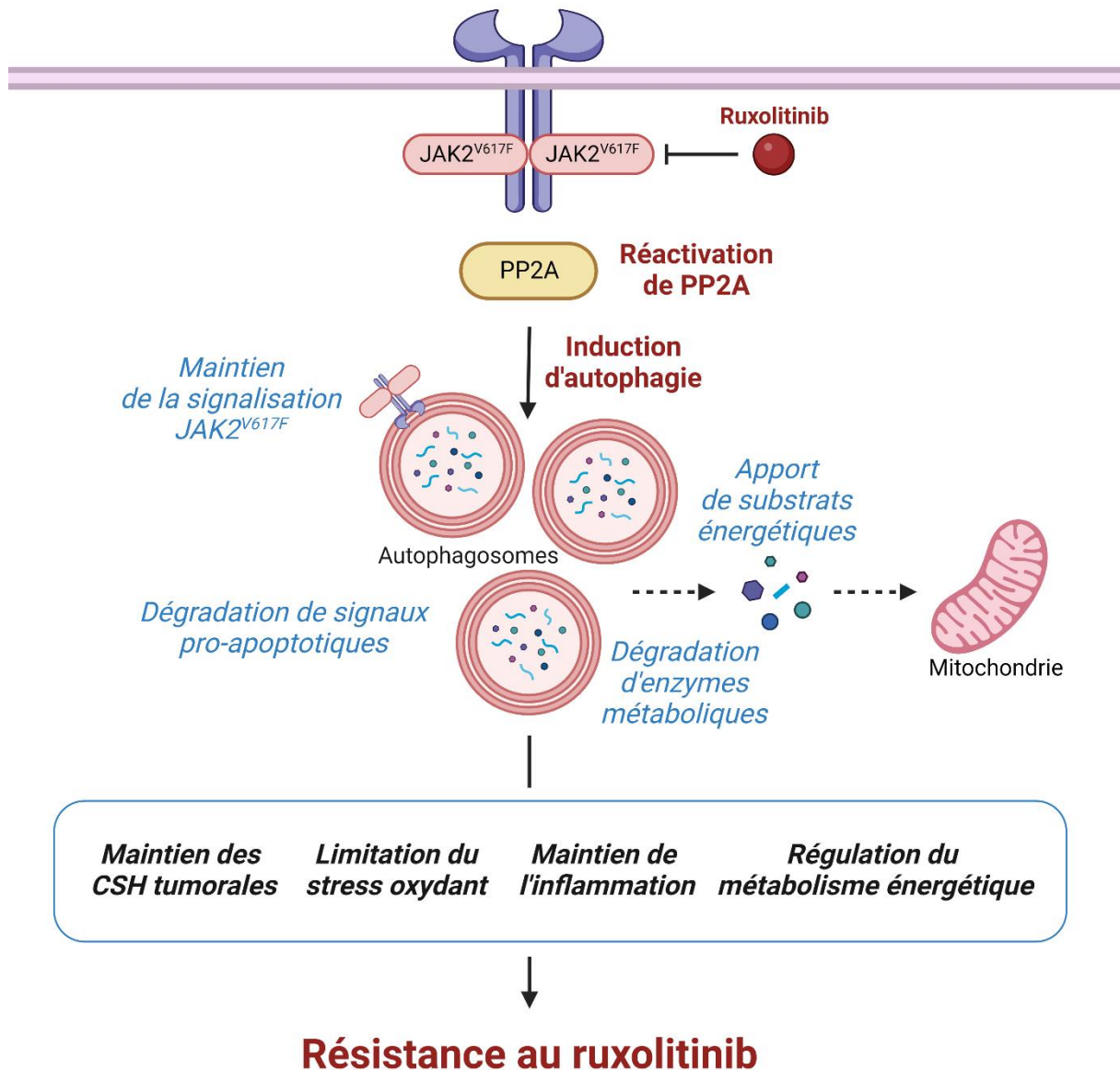
**Figure 40 : Mise au point d'une méthode de purification des autophagosomes dans des cellules leucémiques.**

Les cellules MOLM-14 ont été lysées dans une chambre à cavitation puis les autophagosomes ont été isolés par ultracentrifugation sur gradient discontinu de Nycodenz. (A) Les fractions collectées ont été lysées afin d'analyser par western blot l'enrichissement de marqueurs de différents compartiments subcellulaires. (B). Les fractions correspondant aux autolysosomes et autophagosomes ont été regroupées et observées par microscopie électronique à transmission pour visualiser la morphologie des fractions subcellulaires isolées.

## II. CONCLUSION GENERALE :

Dans ce travail, j'ai montré que l'axe PP2A-autophagie représente une nouvelle cible thérapeutique dans les NMP JAK2<sup>V617F</sup>. Une association du ruxolitinib avec des inhibiteurs de l'autophagie, ou du complexe hétérotrimérique PP2A qui régule ce processus en amont, permettrait d'obtenir une meilleure réponse ciblée sur le clone malin tout en épargnant les cellules hématopoïétiques saines. Dans ce contexte, l'autophagie pourrait participer à la résistance au ruxolitinib d'une part en régulant le métabolisme énergétique et la production de ROS ce qui favoriserait le maintien d'un compartiment de CSH cancéreuses et d'autre part en soutenant la signalisation oncogénique JAK2<sup>V617F</sup> ou en participant à l'établissement d'un phénotype d'inflammation chronique (Figure 41). Une meilleure compréhension du rôle de

l'autophagie dans la biologie des NMP JAK2<sup>V617F</sup> ainsi que des mécanismes qui soutiennent la résistance de ces hémopathies malignes aux inhibiteurs de JAK permettrait de développer de nouveaux traitements dans ces pathologies. Ceci constitue un enjeu majeur en clinique pour limiter les effets secondaires liés aux traitements actuels et l'apparition de complications graves associées à ces pathologies comme l'évolution en myélofibrose ou en LAM.



**Figure 41 : Rôle de l'autophagie dans la résistance au ruxolitinib des NMP JAK2<sup>V617F</sup>.**

Suite à un traitement au ruxolitinib dans des cellules qui expriment JAK2<sup>V617F</sup>, la réactivation de la phosphatase PP2A conduit à l'induction d'une d'autophagie cytoprotectrice. Cette autophagie pourrait contrecarrer les effets du traitement d'une part en régulant ou en alimentant le métabolisme énergétique. Elle pourrait d'autre part limiter le stress oxydant et favoriser le maintien des CSH tumorales. Enfin, l'autophagie induite pourrait contribuer à la régulation de signaux apoptotiques ou encore de la signalisation oncogénique de JAK2<sup>V617F</sup>.



# **BIBLIOGRAPHIE**

Ahn, J.S., Li, J., Chen, E., Kent, D.G., Park, H.J., Green, A.R., 2016. JAK2V617F mediates resistance to DNA damage-induced apoptosis by modulating FOXO3A localization and Bcl-xL deamidation. *Oncogene* 35, 2235–2246. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.285>

Aita, V.M., Liang, X.H., Murty, V.V.V.S., Pincus, D.L., Yu, W., Cayanis, E., Kalachikov, S., Gilliam, T.C., Levine, B., 1999. Cloning and Genomic Organization of Beclin 1, a Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 17q21. *Genomics* 59, 59–65. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5851>

Akada, H., Akada, S., Hutchison, R.E., Sakamoto, K., Wagner, K.-U., Mohi, G., 2014. Critical Role of Jak2 in the Maintenance and Function of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells* 32, 1878–1889. <https://doi.org/10.1002/stem.1711>

Akada, H., Yan, D., Zou, H., Fiering, S., Hutchison, R.E., Mohi, M.G., 2010. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 115, 3589–3597. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-215848>

Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K., Sturgill, T.W., 1990. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343, 651–653. <https://doi.org/10.1038/343651a0>

Andraos, R., Qian, Z., Bonenfant, D., Rubert, J., Vangrevelinghe, E., Scheufler, C., Marque, F., Régnier, C.H., De Pover, A., Ryckelynck, H., Bhagwat, N., Koppikar, P., Goel, A., Wyder, L., Tavares, G., Baffert, F., Pissot-Soldermann, C., Manley, P.W., Gaul, C., Voshol, H., Levine, R.L., Sellers, W.R., Hofmann, F., Radimerski, T., 2012. Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent. *Cancer Discov* 2, 512–523. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0324>

Andreoli, A., Verger, E., Robin, M., Raffoux, E., Zini, J.-M., Rousselot, P., Socié, G., Rea, D., Parquet, N., Giraudier, S., Chomienne, C., Cassinat, B., Kiladjian, J.-J., 2013. Clinical Resistance To Ruxolitinib Is More Frequent In Patients Without MPN-Associated Mutations and Is Rarely Due To Mutations In The JAK2 Kinase Drug-Binding Domain. *Blood* 122, 1591–1591. <https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.1591.1591>

Arrouss, I., Nemati, F., Roncal, F., Wislez, M., Dorgham, K., Vallerand, D., Rabbe, N., Karboul, N., Carlotti, F., Bravo, J., Mazier, D., Decaudin, D., Rebollo, A., 2013. Specific targeting of caspase-9/PP2A interaction as potential new anti-cancer therapy. *PLoS One* 8, e60816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060816>

Auberger, P., Puissant, A., 2017. Autophagy, a key mechanism of oncogenesis and resistance in leukemia. *Blood* 129, 547–552. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-07-692707>

Austin, R.J., Straube, J., Bruedigam, C., Pali, G., Jacquelin, S., Vu, T., Green, J., Gräsel, J., Lansink, L., Cooper, L., Lee, S.-J., Chen, N.-T., Lee, C.-W., Haque, A., Heidel, F.H., D'Andrea, R., Hill, G.R., Mullally, A., Milsom, M.D., Bywater, M., Lane, S.W., 2020. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm

hematopoietic stem cell populations. *Leukemia* 34, 1075–1089. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0638-y>

Bakker, W.J., van Dijk, T.B., Parren-van Amelsvoort, M., Kolbus, A., Yamamoto, K., Steinlein, P., Verhaak, R.G.W., Mak, T.W., Beug, H., Löwenberg, B., von Lindern, M., 2007. Differential Regulation of Foxo3a Target Genes in Erythropoiesis. *Mol Cell Biol* 27, 3839–3854. <https://doi.org/10.1128/MCB.01662-06>

Baquero, P., Dawson, A., Mukhopadhyay, A., Kuntz, E.M., Mitchell, R., Olivares, O., Ianniciello, A., Scott, M.T., Dunn, K., Nicastrì, M.C., Winkler, J.D., Michie, A.M., Ryan, K.M., Halsey, C., Gottlieb, E., Keaney, E.P., Murphy, L.O., Amaravadi, R.K., Holyoake, T.L., Helgason, G.V., 2019. Targeting quiescent leukemic stem cells using second generation autophagy inhibitors. *Leukemia* 33, 981–994. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0252-4>

Barosi, G., Birgegard, G., Finazzi, G., Grieshammer, M., Harrison, C., Hasselbalch, H., Kiladijan, J.-J., Lengfelder, E., Mesa, R., Mc Mullin, M.F., Passamonti, F., Reilly, J.T., Vannucchi, A.M., Barbui, T., 2010. A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythaemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *British Journal of Haematology* 148, 961–963. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.08019.x>

Bartalucci, N., Calabresi, L., Balliu, M., Martinelli, S., Rossi, M.C., Villeval, J.L., Annunziato, F., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., 2017. Inhibitors of the PI3K/mTOR pathway prevent STAT5 phosphorylation in *JAK2V617F* mutated cells through PP2A/CIP2A axis. *Oncotarget* 8, 96710–96724. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18073>

Bartalucci, N., Tozzi, L., Bogani, C., Martinelli, S., Rotunno, G., Villeval, J., Vannucchi, A.M., 2013. Co-targeting the PI3K/ mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. *J. Cell. Mol. Med.* 17, 1385–1396. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12162>

Bauvy, C., Meijer, A.J., Codogno, P., 2009. Chapter 4 Assaying of Autophagic Protein Degradation, in: *Methods in Enzymology, Autophagy in Mammalian Systems, Part B*. Academic Press, pp. 47–61. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03604-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03604-5)

Baxter 2005 JAK2V617F.pdf, n.d.

B'chir, W., Maurin, A.-C., Carraro, V., Averous, J., Jousse, C., Muranishi, Y., Parry, L., Stepien, G., Fafournoux, P., Bruhat, A., 2013. The eIF2 $\alpha$ /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Research* 41, 7683–7699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt563>

Becker, A.J., McCULLOCH, E.A., Till, J.E., 1963. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452–454. <https://doi.org/10.1038/197452a0>

Bellodi, C., Lidonnici, M.R., Hamilton, A., Helgason, G.V., Soliera, A.R., Ronchetti, M., Galavotti, S., Young, K.W., Selmi, T., Yacobi, R., Van Etten, R.A., Donato, N., Hunter, A., Dinsdale, D., Tirrò, E., Vigneri, P., Nicotera, P., Dyer, M.J., Holyoake, T., Salomoni, P.,

Calabretta, B., 2009. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor–induced cell death in Philadelphia chromosome–positive cells, including primary CML stem cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1109–1123. <https://doi.org/10.1172/JCI35660>

Benlabiod, C., Dagher, T., Marty, C., Villeval, J.-L., 2022. Lessons from mouse models of MPN, in: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 125–185. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.02.009>

Berdeja, J., Palandri, F., Baer, M.R., Quick, D., Kiladjian, J.J., Martinelli, G., Verma, A., Hamid, O., Walgren, R., Pitou, C., Li, P.L., Gerds, A.T., 2018. Phase 2 study of gandotinib (LY2784544) in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research* 71, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.06.014>

Bhagwat, N., Koppikar, P., Keller, M., Marubayashi, S., Shank, K., Rampal, R., Qi, J., Kleppe, M., Patel, H.J., Shah, S.K., Taldone, T., Bradner, J.E., Chiosis, G., Levine, R.L., 2014. Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123, 2075–2083. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-547760>

Bosc, C., Broin, N., Fanjul, M., Saland, E., Farge, T., Courdy, C., Batut, A., Masoud, R., Larrue, C., Skuli, S., Espagnolle, N., Pagès, J.-C., Carrier, A., Bost, F., Bertrand-Michel, J., Tamburini, J., Récher, C., Bertoli, S., Mansat-De Mas, V., Manenti, S., Sarry, J.-E., Joffre, C., 2020. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun* 11, 4056. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17882-2>

Bradley, T., Metcalf, D., 1966. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *Aust J Exp Biol Med* 44, 287–300. <https://doi.org/10.1038/icb.1966.28>

Buenrostro, J.D., Corces, M.R., Lareau, C.A., Wu, B., Schep, A.N., Aryee, M.J., Majeti, R., Chang, H.Y., Greenleaf, W.J., 2018. Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell* 173, 1535-1548.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.074>

Bumm, T.G.P., Elsea, C., Corbin, A.S., Loriaux, M., Sherbenou, D., Wood, L., Deininger, J., Silver, R.T., Druker, B.J., Deininger, M.W.N., 2006. Characterization of Murine JAK2V617F-Positive Myeloproliferative Disease. *Cancer Research* 66, 11156–11165. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2210>

Cao, Y., Cai, J., Zhang, S., Yuan, N., Li, X., Fang, Y., Song, L., Shang, M., Liu, S., Zhao, W., Hu, S., Wang, J., 2015. Loss of autophagy leads to failure in megakaryopoiesis, megakaryocyte differentiation, and thrombopoiesis in mice. *Experimental Hematology* 43, 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.01.001>

Chang, K.-C., Liu, P.-F., Chang, C.-H., Lin, Y.-C., Chen, Y.-J., Shu, C.-W., 2022. The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. *Cell & Bioscience* 12, 1. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00736-9>

Chen, E., Ahn, J.S., Massie, C.E., Clynes, D., Godfrey, A.L., Li, J., Park, H.J., Nangalia, J., Silber, Y., Mullally, A., Gibbons, R.J., Green, A.R., 2014. JAK2V617F promotes replication fork

stalling with disease-restricted impairment of the intra-S checkpoint response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 15190–15195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401873111>

Chen, W., Gu, P., Jiang, X., Ruan, H.-B., Li, C., Gao, X., 2011. Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit  $\alpha$  (PP2A $\alpha$ ) Maintains Survival of Committed Erythroid Cells in Fetal Liver Erythropoiesis through the STAT5 Pathway. *The American Journal of Pathology* 178, 2333–2343. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.01.041>

Chen, Z., Nie, S.-D., Qu, M.-L., Zhou, D., Wu, L.-Y., Shi, X.-J., Ma, L.-R., Li, X., Zhou, S.-L., Wang, S., Wu, J., 2018. The autophagic degradation of Cav-1 contributes to PA-induced apoptosis and inflammation of astrocytes. *Cell Death Dis* 9, 771. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0795-3>

Choi, C.-H., Lee, B.-H., Ahn, S.-G., Oh, S.-H., 2012. Proteasome inhibition-induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *Biochemical and Biophysical Research Communications* 418, 759–764. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.01.095>

Choundhury, S., Kolukula, V., Preet, A., Albanese, C., avantaggiati, maria, 2013. Dissecting the pathways that destabilize mutant p53: The proteasome or autophagy? *Cell Cycle* 12, 1022–1029. <https://doi.org/10.4161/cc.24128>

Chung, V., Mansfield, A.S., Braithe, F., Richards, D., Durivage, H., Ungerleider, R.S., Johnson, F., Kovach, J.S., 2017. Safety, Tolerability, and Preliminary Activity of LB-100, an Inhibitor of Protein Phosphatase 2A, in Patients with Relapsed Solid Tumors: An Open-Label, Dose Escalation, First-in-Human, Phase I Trial. *Clinical Cancer Research* 23, 3277–3284. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2299>

Clemens, M.J., Elia, A., 1997. The Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR: Structure and Function. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 17, 503–524. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.503>

Cleyrat, C., Darehshouri, A., Steinkamp, M.P., Vilaine, M., Boassa, D., Ellisman, M.H., Hermouet, S., Wilson, B.S., 2014. Mpl Traffics to the Cell Surface Through Conventional and Unconventional Routes. *Traffic* 15, 961–982. <https://doi.org/10.1111/tra.12185>

Colecchia, D., Rossi, M., Sasdelli, F., Sanzone, S., Strambi, A., Chiariello, M., 2015. MAPK15 mediates BCR-ABL1-induced autophagy and regulates oncogene-dependent cell proliferation and tumor formation. *Autophagy* 11, 1790–1802. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1084454>

Colecchia, D., Strambi, A., Sanzone, S., Iavarone, C., Rossi, M., Dall'Armi, C., Piccioni, F., Verrotti di Pianella, A., Chiariello, M., 2012. MAPK15/ERK8 stimulates autophagy by interacting with LC3 and GABARAP proteins. *Autophagy* 8, 1724–1740. <https://doi.org/10.4161/auto.21857>

Corazzari, M., Rapino, F., Ciccocanti, F., Giglio, P., Antonioli, M., Conti, B., Fimia, G.M., Lovat, P.E., Piacentini, M., 2015. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition



resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ* 22, 946–958. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.183>

Cristóbal, I., Blanco, F.J., Garcia-Orti, L., Marcotegui, N., Vicente, C., Rifon, J., Novo, F.J., Bandres, E., Calasanz, M.J., Bernabeu, C., Odero, M.D., 2010. SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 115, 615–625. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-227363>

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, J.-J., Villeval, J.-L., de Thé, H., 2021. JAK2V617F myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML. *Journal of Experimental Medicine* 218, e20201268. <https://doi.org/10.1084/jem.20201268>

Dany, M., Gencer, S., Nganga, R., Thomas, R.J., Oleinik, N., Baron, K.D., Szulc, Z.M., Ruvolo, P., Kornblau, S., Andreeff, M., Ogretmen, B., 2016. Targeting FLT3-ITD signaling mediates ceramide-dependent mitophagy and attenuates drug resistance in AML. *Blood* 128, 1944–1958. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-708750>

Dawson, M.A., Bannister, A.J., Göttgens, B., Foster, S.D., Bartke, T., Green, A.R., Kouzarides, T., 2009. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 $\alpha$  from chromatin. *Nature* 461, 819–822. <https://doi.org/10.1038/nature08448>

Degenhardt, K., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gélinas, C., Fan, Y., Nelson, D.A., Jin, S., White, E., 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10, 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.06.001>

Denoyelle, C., Abou-Rjaily, G., Bezrookove, V., Verhaegen, M., Johnson, T.M., Fullen, D.R., Pointer, J.N., Gruber, S.B., Su, L.D., Nikiforov, M.A., Kaufman, R.J., Bastian, B.C., Soengas, M.S., 2006. Anti-oncogenic role of the endoplasmic reticulum differentially activated by mutations in the MAPK pathway. *Nat Cell Biol* 8, 1053–1063. <https://doi.org/10.1038/ncb1471>

Deshpande, A., Reddy, M.M., Schade, G.O.M., Ray, A., Chowdary, T.K., Griffin, J.D., Sattler, M., 2012. Kinase domain mutations confer resistance to novel inhibitors targeting JAK2V617F in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 26, 708–715. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.255>

Doherty, J., Baehrecke, E.H., 2018. Life, death and autophagy. *Nat Cell Biol* 20, 1110–1117. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0201-5>

Duan, Y., Tian, X., Liu, Q., Jin, J., Shi, J., Hou, Y., 2021. Role of autophagy on cancer immune escape. *Cell Commun Signal* 19, 91. <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00769-0>

Dupont, M., Huart, M., Lauvinerie, C., Bidet, A., Guitart, A.V., Villacreces, A., Vigon, I., Desplat, V., El Habhab, A., Pigneux, A., Ivanovic, Z., Brunet De la Grange, P., Dumas, P.-Y., Pasquet, J.-M., 2022. Autophagy Targeting and Hematological Mobilization in FLT3-ITD Acute Myeloid Leukemia Decrease Repopulating Capacity and Relapse by Inducing Apoptosis of

Committed Leukemic Cells. *Cancers (Basel)* 14, 453.  
<https://doi.org/10.3390/cancers14020453>

Durrant, S.T., Nagler, A., Guglielmelli, P., Lavie, D., le Coutre, P., Gisslinger, H., Chuah, C., Maffioli, M., Bharathy, S., Dong, T., Wroclawska, M., Lopez, J.M., 2019. Results from HARMONY: an open-label, multicenter, 2-arm, phase 1b, dose-finding study assessing the safety and efficacy of the oral combination of ruxolitinib and buparlisib in patients with myelofibrosis. *Haematologica* 104, e551–e554.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2018.209965>

Eales, K.L., Hollinshead, K.E.R., Tennant, D.A., 2016. Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5, e190–e190. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2015.50>

Elgendy, M., Sheridan, C., Brumatti, G., Martin, S.J., 2011. Oncogenic Ras-Induced Expression of Noxa and Beclin-1 Promotes Autophagic Cell Death and Limits Clonogenic Survival. *Molecular Cell* 42, 23–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.009>

Esteban-Martínez, L., Sierra-Filardi, E., McGreal, R.S., Salazar-Roa, M., Mariño, G., Seco, E., Durand, S., Enot, D., Graña, O., Malumbres, M., Cvekl, A., Cuervo, A.M., Kroemer, G., Boya, P., 2017. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J* 36, 1688–1706. <https://doi.org/10.15252/embj.201695916>

Fatrai, S., Wierenga, A.T.J., Daenen, S.M.G.J., Vellenga, E., Schuringa, J.J., 2011. Identification of HIF2 $\alpha$  as an important STAT5 target gene in human hematopoietic stem cells. *Blood* 117, 3320–3330. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-303669>

Folkerts, H., Wierenga, A.T., van den Heuvel, F.A., Woldhuis, R.R., Kluit, D.S., Jaques, J., Schuringa, J.J., Vellenga, E., 2019. Elevated VMP1 expression in acute myeloid leukemia amplifies autophagy and is protective against venetoclax-induced apoptosis. *Cell Death Dis* 10, 421. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1648-4>

Fujiki, H., and Suganuma, M., 1993. Tumor promotion by inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A: the okadaic acid class of compounds. *Adv Cancer Res.* 61, 143-94.

Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Abe, M., Sonoda, Y., Kasahara, T., 2010. STAT5 Activation Is Critical for the Transformation Mediated by Myeloproliferative Disorder-associated JAK2 V617F Mutant. *Journal of Biological Chemistry* 285, 5296–5307. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040733>

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J.M., Amaravadi, R.K., Baehrecke, E.H., Cecconi, F., Codogno, P., Debnath, J., Gewirtz, D.A., Karantza, V., Kimmelman, A., Kumar, S., Levine, B., Maiuri, M.C., Martin, S.J., Penninger, J., Piacentini, M., Rubinsztein, D.C., Simon, H., Simonsen, A., Thorburn, A.M., Velasco, G., Ryan, K.M., Kroemer, G., 2015. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 34, 856–880. <https://doi.org/10.15252/embj.201490784>

Galluzzi, L., Pietrocola, F., Levine, B., Kroemer, G., 2014. Metabolic Control of Autophagy. *Cell* 159, 1263–1276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.006>

Gatica, D., Lahiri, V., Klionsky, D.J., 2018. Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* 20, 233–242. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0037-z>

Gautier, E.-F., Picard, M., Laurent, C., Marty, C., Villeval, J.-L., Delhommeau, F., Hexner, E., 2012. The cell cycle regulator CDC25A is a target for JAK2V617F oncogene 119, 11.

Genovese, G., Kähler, A.K., Handsaker, R.E., Lindberg, J., Rose, S.A., Bakhoum, S.F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B.M., Fromer, M., Purcell, S.M., Svantesson, O., Landén, M., Höglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S.B., Moran, J.L., Lander, E.S., Sullivan, P.F., Sklar, P., Grönberg, H., Hultman, C.M., McCarroll, S.A., 2014. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med* 371, 2477–2487. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>

Girodon, F., Steinkamp, M.P., Cleyrat, C., Hermouet, S., Wilson, B.S., 2011. Confocal imaging studies cast doubt on nuclear localization of JAK2V617F. *Blood* 118, 2633–2634. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-02-336479>

Godet, A.N., Guergnon, J., Galioot, A., Falanga, P.-B., Colle, J.-H., Cayla, X., Garcia, A., 2011. La famille des protéine phosphatases PP2A: Une cible stratégique pour les virus et pour la transformation tumorale. *Med Sci (Paris)* 27, 1106–1111. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112712017>

Goldberg, A.A., Nkengfac, B., Sanchez, A.M.J., Moroz, N., Qureshi, S.T., Koromilas, A.E., Wang, S., Burelle, Y., Hussain, S.N., Kristof, A.S., 2017. Regulation of ULK1 Expression and Autophagy by STAT1. *Journal of Biological Chemistry* 292, 1899–1909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.771584>

Goussetis, D.J., Gounaris, E., Wu, E.J., Vakana, E., Sharma, B., Bogyo, M., Altman, J.K., Plataniias, L.C., 2012. Autophagic degradation of the BCR-ABL oncoprotein and generation of antileukemic responses by arsenic trioxide. *Blood* 120, 3555–3562. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402578>

Grebien, F., Kerényi, M.A., Kovacic, B., Kolbe, T., Becker, V., Dolznig, H., Pfeffer, K., Klingmüller, U., Müller, M., Beug, H., Müllner, E.W., Moriggl, R., 2008. Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2. *Blood* 111, 4511–4522. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-102848>

Green, D.R., Galluzzi, L., Kroemer, G., 2011. Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science* 333, 1109–1112. <https://doi.org/10.1126/science.1201940>

Gu, Z., Liu, Y., Cai, F., Patrick, M., Zmajkovic, J., Cao, H., Zhang, Y., Tasdogan, A., Chen, M., Qi, L., Liu, X., Li, K., Lyu, J., Dickerson, K.E., Chen, W., Ni, M., Merritt, M.E., Morrison, S.J., Skoda, R.C., DeBerardinis, R.J., Xu, J., 2019. Loss of EZH2 Reprograms BCAA Metabolism to Drive Leukemic Transformation. *Cancer Discovery* 9, 1228–1247. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0152>

Guergnon, J., Dessauge, F., Dominguez, V., Viallet, J., Bonnefoy, S., Yuste, V.J., Mercereau-Puijalon, O., Cayla, X., Rebollo, A., Susin, S.A., Bost, P.-E., Garcia, A., 2006. Use

of penetrating peptides interacting with PP1/PP2A proteins as a general approach for a drug phosphatase technology. *Mol Pharmacol* 69, 1115–1124. <https://doi.org/10.1124/mol.105.019364>

Gump, J.M., Staskiewicz, L., Morgan, M.J., Bamberg, A., Riches, D.W.H., Thorburn, A., 2014. Autophagy variation within a cell population determines cell fate through selective degradation of Fap-1. *Nat Cell Biol* 16, 47–54. <https://doi.org/10.1038/ncb2886>

Guo, J.Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., Collier, H.A., DiPaola, R.S., Gelinas, C., Rabinowitz, J.D., White, E., 2011. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 25, 460–470. <https://doi.org/10.1101/gad.2016311>

Han, A.-P., Yu, C., Lu, L., Fujiwara, Y., Browne, C., Chin, G., Fleming, M., Leboulch, P., Orkin, S.H., Chen, J.-J., n.d. Heme-regulated eIF2a kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency 10.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum- resident kinase 397, 5.

Harrison, C., Kiladjan, J.-J., Al-Ali, H.K., Gisslinger, H., Waltzman, R., Stalbovska, V., McQuitty, M., Hunter, D.S., Levy, R., Knoops, L., Cervantes, F., Vannucchi, A.M., Barbui, T., Barosi, G., 2012. JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis. *N Engl J Med* 366, 787–798. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110556>

Harrison, C.N., Schaap, N., Vannucchi, A.M., Kiladjan, J.-J., Tiu, R.V., Zachee, P., Jourdan, E., Winton, E., Silver, R.T., Schouten, H.C., Passamonti, F., Zweegman, S., Talpaz, M., Lager, J., Shun, Z., Mesa, R.A., 2017. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol* 4, e317–e324. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30088-1](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30088-1)

Harrison, C.N., Vannucchi, A.M., Kiladjan, J.-J., Al-Ali, H.K., Gisslinger, H., Knoops, L., Cervantes, F., Jones, M.M., Sun, K., McQuitty, M., Stalbovska, V., Gopalakrishna, P., Barbui, T., 2016. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* 30, 1701–1707. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.148>

Hart, L.S., Cunningham, J.T., Datta, T., Dey, S., Tameire, F., Lehman, S.L., Qiu, B., Zhang, H., Cerniglia, G., Bi, M., Li, Y., Gao, Y., Liu, H., Li, C., Maity, A., Thomas-Tikhonenko, A., Perl, A.E., Koong, A., Fuchs, S.Y., Diehl, J.A., Mills, I.G., Ruggero, D., Koumenis, C., 2012. ER stress-mediated autophagy promotes Myc-dependent transformation and tumor growth. *J Clin Invest* 122, 4621–4634. <https://doi.org/10.1172/JCI62973>

- Hasegawa, J., Tokuda, E., Yao, Y., Sasaki, T., Inoki, K., Weisman, L.S., 2022. PP2A-dependent TFEB activation is blocked by PIKfyve-induced mTORC1 activity. *Mol Biol Cell* 33, ar26. <https://doi.org/10.1091/mbc.E21-06-0309>
- Hattori, A., Tsunoda, M., Konuma, T., Kobayashi, M., Nagy, T., Glushka, J., Tayyari, F., McSkimming, D., Kannan, N., Tojo, A., Edison, A.S., Ito, T., 2017. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukemia. *Nature* 545, 500–504. <https://doi.org/10.1038/nature22314>
- Hermouet, S., Bigot-Corbel, E., Gardie, B., 2015. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/145293>
- Hertz, E.P.T., Kruse, T., Davey, N.E., López-Méndez, B., Sigurðsson, J.O., Montoya, G., Olsen, J.V., Nilsson, J., 2016. A Conserved Motif Provides Binding Specificity to the PP2A-B56 Phosphatase. *Molecular Cell* 63, 686–695. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.06.024>
- Heydt, Q., Larrue, C., Saland, E., Bertoli, S., Sarry, J.-E., Besson, A., Manenti, S., Joffre, C., Mansat-De Mas, V., 2018. Oncogenic FLT3-ITD supports autophagy via ATF4 in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 37, 787–797. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.376>
- Ho, T.T., Warr, M.R., Adelman, E.R., Lansinger, O.M., Flach, J., Verovskaya, E.V., Figueroa, M.E., Passequé, E., 2017. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 543, 205–210. <https://doi.org/10.1038/nature21388>
- Holen, I., Gordon, P.B., Seglen, P.O., 1993. Inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid and other protein phosphatase inhibitors. *Eur J Biochem* 215, 113–122. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18013.x>
- Holmström, K.M., Finkel, T., 2014. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 411–421. <https://doi.org/10.1038/nrm3801>
- Hou, W., Xie, Y., Song, X., Sun, X., Lotze, M.T., Zeh, H.J., Kang, R., Tang, D., 2016. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin. *Autophagy* 12, 1425–1428. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1187366>
- Hu, X., Dutta, P., Tsurumi, A., Li, J., Wang, J., Land, H., Li, W.X., 2013. Unphosphorylated STAT5A stabilizes heterochromatin and suppresses tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 10213–10218. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221243110>
- Hu, Z., Sankar, D.S., Vu, B., Leytens, A., Vionnet, C., Wu, W., Stumpe, M., Martínez-Martínez, E., Stork, B., Dengjel, J., 2021. ULK1 phosphorylation of striatin activates protein phosphatase 2A and autophagy. *Cell Reports* 36, 109762. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109762>
- Huddleston, H., Tan, B., Yang, F.-C., White, H., Wenning, M.J., Orazi, A., Yoder, M.C., Kapur, R., Ingram, D.A., 2003. Functional p85 $\alpha$  gene is required for normal murine fetal erythropoiesis. *Blood* 102, 142–145. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-10-3245>

Ianniciello, A., Zarou, M.M., Rattigan, K.M., Scott, M., Dawson, A., Dunn, K., Brabcova, Z., Kalkman, E.R., Nixon, C., Michie, A.M., Copland, M., Vetrie, D., Ambler, M., Saxty, B., Helgason, G.V., 2021. ULK1 inhibition promotes oxidative stress-induced differentiation and sensitizes leukemic stem cells to targeted therapy. *Sci Transl Med* 13, eabd5016. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abd5016>

Ihle, J., 1995. The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Seminars in Immunology* 7, 247–254. <https://doi.org/10.1006/smim.1995.0029>

Isakson, P., Bjørås, M., Bøe, S.O., Simonsen, A., 2010. Autophagy contributes to therapy-induced degradation of the PML/RARA oncoprotein. *Blood* 116, 2324–2331. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261040>

Ishida, S., Akiyama, H., Umezawa, Y., Okada, K., Nogami, A., Oshikawa, G., Nagao, T., Miura, O., 2018. Mechanisms for mTORC1 activation and synergistic induction of apoptosis by ruxolitinib and BH3 mimetics or autophagy inhibitors in JAK2-V617F-expressing leukemic cells including newly established PVTL-2. *Oncotarget* 9, 26834–26851. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25515>

Ito, Kyoko, Turcotte, R., Cui, J., Zimmerman, S.E., Pinho, S., Mizoguchi, T., Arai, F., Runnels, J.M., Alt, C., Teruya-Feldstein, J., Mar, J.C., Singh, R., Suda, T., Lin, C.P., Frenette, P.S., Ito, Keisuke, 2016. Self-renewal of a purified *Tie2*<sup>+</sup> hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science* 354, 1156–1160. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5530>

Jacquel, A., Obba, S., Boyer, L., Dufies, M., Robert, G., Gounon, P., Lemichez, E., Luciano, F., Solary, E., Auberger, P., 2012. Autophagy is required for CSF-1-induced macrophagic differentiation and acquisition of phagocytic functions. *Blood* 119, 4527–4531. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392167>

Jaiswal, S., Fontanillas, P., Flannick, J., Manning, A., Grauman, P.V., Mar, B.G., Lindsley, R.C., Mermel, C.H., Burt, N., Chavez, A., Higgins, J.M., Moltchanov, V., Kuo, F.C., Kluk, M.J., Henderson, B., Kinnunen, L., Koistinen, H.A., Ladenvall, C., Getz, G., Correa, A., Banahan, B.F., Gabriel, S., Kathiresan, S., Stringham, H.M., McCarthy, M.I., Boehnke, M., Tuomilehto, J., Haiman, C., Groop, L., Atzmon, G., Wilson, J.G., Neuberg, D., Altshuler, D., Ebert, B.L., 2014. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* 371, 2488–2498. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>

James, C., Ugo, V., Le Couédic, J.-P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garçon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., Villeval, J.L., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., 2005. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434, 1144–1148. <https://doi.org/10.1038/nature03546>

Jatiani, S.S., Cosenza, S.C., Reddy, M.V.R., Ha, J.H., Baker, S.J., Samanta, A.K., Olnes, M.J., Pfannes, L., Sloand, E.M., Arlinghaus, R.B., Reddy, E.P., 2010. A Non-ATP-Competitive

Dual Inhibitor of JAK2V617F and BCR-ABL T315I Kinases. *Genes Cancer* 1, 331–345. <https://doi.org/10.1177/1947601910371337>

Jaumot, M., Hancock, J.F., 2001. Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions. *Oncogene* 20, 3949–3958. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204526>

Jiang, S., Heller, B., Tagliabracci, V.S., Zhai, L., Irimia, J.M., DePaoli-Roach, A.A., Wells, C.D., Skurat, A.V., Roach, P.J., 2010. Starch Binding Domain-containing Protein 1/Genethonin 1 Is a Novel Participant in Glycogen Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 285, 34960–34971. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.150839>

Jiao, L., Zhang, H.-L., Li, D.-D., Yang, K.-L., Tang, J., Li, X., Ji, J., Yu, Y., Wu, R.-Y., Ravichandran, S., Liu, J.-J., Feng, G.-K., Chen, M.-S., Zeng, Y.-X., Deng, R., Zhu, X.-F., 2018. Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2). *Autophagy* 14, 671–684. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1381804>

Joffre, C., Djavaheri-Mergny, M., Patingre, S., Giuriato, S., 2017. L'autophagie : le yin et le yang des cancers. *Med Sci (Paris)* 33, 328–334. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173303021>

Joffre, C., Ducau, C., Poillet-Perez, L., Courdy, C., Mansat-De Mas, V., 2021. Autophagy a Close Relative of AML Biology. *Biology* 10, 552. <https://doi.org/10.3390/biology10060552>

Kang, Y.-A., Sanalkumar, R., O'Geen, H., Linnemann, A.K., Chang, C.-J., Bouhassira, E.E., Farnham, P.J., Keles, S., Bresnick, E.H., 2012. Autophagy Driven by a Master Regulator of Hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 32, 226–239. <https://doi.org/10.1128/MCB.06166-11>

Karsli-Uzunbas, G., Guo, J.Y., Price, S., Teng, X., Laddha, S.V., Khor, S., Kalaany, N.Y., Jacks, T., Chan, C.S., Rabinowitz, J.D., White, E., 2014. Autophagy Is Required for Glucose Homeostasis and Lung Tumor Maintenance. *Cancer Discovery* 4, 914–927. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0363>

Karvela, M., Baquero, P., Kuntz, E.M., Mukhopadhyay, A., Mitchell, R., Allan, E.K., Chan, E., Kranc, K.R., Calabretta, B., Salomoni, P., Gottlieb, E., Holyoake, T.L., Helgason, G.V., 2016. ATG7 regulates energy metabolism, differentiation and survival of Philadelphia-chromosome-positive cells. *Autophagy* 12, 936–948. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1162359>

Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>

Kawashima, I., Kirito, K., 2016. Metformin inhibits JAK2V617F activity in MPN cells by activating AMPK and PP2A complexes containing the B56 $\alpha$  subunit. *Experimental Hematology* 44, 1156–1165.e4. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2016.08.005>

Keil, E., Höcker, R., Schuster, M., Essmann, F., Ueffing, N., Hoffman, B., Liebermann, D.A., Pfeffer, K., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I., 2013. Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 $\beta$ -MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death Differ* 20, 321–332. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.129>

Kent, G., Volini, F.I., ORFEi, E., n.d. AUTOPHAGIC VACUOLES IN HUMAN RED CELLS 27.

Khoury, J.D., Solary, E., Abla, O., Akkari, Y., Alaggio, R., Apperley, J.F., Bejar, R., Berti, E., Busque, L., Chan, J.K.C., Chen, W., Chen, X., Chng, W.-J., Choi, J.K., Colmenero, I., Coupland, S.E., Cross, N.C.P., De Jong, D., Elghetany, M.T., Takahashi, E., Emile, J.-F., Ferry, J., Fogelstrand, L., Fontenay, M., Germing, U., Gujral, S., Haferlach, T., Harrison, C., Hodge, J.C., Hu, S., Jansen, J.H., Kanagal-Shamanna, R., Kantarjian, H.M., Kratz, C.P., Li, X.-Q., Lim, M.S., Loeb, K., Loghavi, S., Marcogliese, A., Meshinchi, S., Michaels, P., Naresh, K.N., Natkunam, Y., Nejati, R., Ott, G., Padron, E., Patel, K.P., Patkar, N., Picarsic, J., Platzbecker, U., Roberts, I., Schuh, A., Sewell, W., Siebert, R., Tembhare, P., Tyner, J., Verstovsek, S., Wang, W., Wood, B., Xiao, W., Yeung, C., Hochhaus, A., 2022. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia* 36, 1703–1719. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>

Kim, J., Kim, Y.C., Fang, C., Russell, R.C., Kim, J.H., Fan, W., Liu, R., Zhong, Q., Guan, K.-L., 2013. Differential Regulation of Distinct Vps34 Complexes by AMPK in Nutrient Stress and Autophagy. *Cell* 152, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.016>

Kim, K., Baek, A., Hwang, J.-E., Choi, Y.A., Jeong, J., Lee, M.-S., Cho, D.H., Lim, J.-S., Kim, K.I., Yang, Y., 2009. Adiponectin-Activated AMPK Stimulates Dephosphorylation of AKT through Protein Phosphatase 2A Activation. *Cancer Research* 69, 4018–4026. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2641>

Kinoshita, E., Kinoshita-Kikuta, E., Koike, T., 2012. Phos-tag SDS-PAGE systems for phosphorylation profiling of proteins with a wide range of molecular masses under neutral pH conditions. *Proteomics* 12, 192–202. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100524>

Klionsky, D.J., Abdel-Aziz, A.K., Abdelfatah, S., Abdellatif, M., Abdoli, A., Abel, S., Abeliovich, H., Abildgaard, M.H., Abudu, Y.P., Acevedo-Arozena, A., et al., 2021. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) <sup>1</sup>. *Autophagy* 17, 1–382. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1797280>

Koppikar, P., Bhagwat, N., Kilpivaara, O., Manshouri, T., Adli, M., Hricik, T., Liu, F., Saunders, L.M., Mullally, A., Abdel-Wahab, O., Leung, L., Weinstein, A., Marubayashi, S., Goel, A., Gönen, M., Estrov, Z., Ebert, B.L., Chiosis, G., Nimer, S.D., Bernstein, B.E., Verstovsek, S., Levine, R.L., 2012. Heterodimeric JAK–STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature* 489, 155–159. <https://doi.org/10.1038/nature11303>

Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A.S., Teo, S.-S., Tiedt, R., Passweg, J.R., Tichelli, A., Cazzola, M., Skoda, R.C., 2005. A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders. *N Engl J Med* 352, 1779–1790. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051113>

Kuntz, E.M., Baquero, P., Michie, A.M., Dunn, K., Tardito, S., Holyoake, T.L., Helgason, G.V., Gottlieb, E., 2017. Targeting mitochondrial oxidative phosphorylation eradicates therapy-



resistant chronic myeloid leukemic stem cells. *Nat Med* 23, 1234–1240. <https://doi.org/10.1038/nm.4399>

Lacout, C., Pisani, D.F., Tulliez, M., Gachelin, F.M., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., 2006. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 108, 1652–1660. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002030>

Lamark, T., Johansen, T., n.d. Mechanisms of Selective Autophagy 29.

Laplanche, M., Sabatini, D.M., 2009. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 3589–3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.051011>

Larrue, C., Heydt, Q., Saland, E., Boutzen, H., Kaoma, T., Sarry, J.-E., Joffre, C., Récher, C., 2019. Oncogenic KIT mutations induce STAT3-dependent autophagy to support cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Oncogenesis* 8, 39. <https://doi.org/10.1038/s41389-019-0148-9>

Larrue, C., Saland, E., Boutzen, H., Vergez, F., David, M., Joffre, C., Hospital, M.-A., Tamburini, J., Delabesse, E., Manenti, S., Sarry, J.E., Récher, C., 2016. Proteasome inhibitors induce FLT3-ITD degradation through autophagy in AML cells. *Blood* 127, 882–892. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-05-646497>

Laubach, J.P., Fu, P., Jiang, X., Salter, K.H., Potti, A., Arcasoy, M.O., 2009. Polycythemia vera erythroid precursors exhibit increased proliferation and apoptosis resistance associated with abnormal RAS and PI3K pathway activation. *Experimental Hematology* 37, 1411–1422. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.09.009>

Laurenti, E., Göttgens, B., 2018. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature* 553, 418–426. <https://doi.org/10.1038/nature25022>

Lazova, R., Camp, R.L., Klump, V., Siddiqui, S.F., Amaravadi, R.K., Pawelek, J.M., 2012. Punctate LC3B Expression Is a Common Feature of Solid Tumors and Associated with Proliferation, Metastasis, and Poor Outcome. *Clinical Cancer Research* 18, 370–379. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1282>

Lemasters, J.J., 2005. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Research* 8, 3–5. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>

Leroy, E., Constantinescu, S.N., 2017. Rethinking JAK2 inhibition: towards novel strategies of more specific and versatile janus kinase inhibition. *Leukemia* 31, 1023–1038. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.43>

Levine, R.L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B.L., Wernig, G., Huntly, B.J.P., Boggon, T.J., Wlodarska, I., Clark, J.J., Moore, S., Adelsperger, J., Koo, S., Lee, J.C., Gabriel, S., Mercher, T., D'Andrea, A., Fröhling, S., Döhner, K., Marynen, P., Vandenberghe, P., Mesa, R.A., Tefferi, A., Griffin, J.D., Eck, M.J., Sellers, W.R., Meyerson, M., Golub, T.R., Lee, S.J., Gilliland, D.G., 2005. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential

thrombocytopenia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387–397. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.03.023>

Li, J., Spensberger, D., Ahn, J.S., Anand, S., Beer, P.A., Ghevaert, C., Chen, E., Forrai, A., Scott, L.M., Ferreira, R., Campbell, P.J., Watson, S.P., Liu, P., Erber, W.N., Huntly, B.J.P., Ottersbach, K., Green, A.R., 2010. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F–positive essential thrombocytopenia. *Blood* 116, 1528–1538. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259747>

Li, W., Li, J., Bao, J., 2012. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1125–1136. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>

Li, Yinghui, Li, Yafang, Yin, J., Wang, C., Yang, M., Gu, J., He, M., Xu, H., Fu, W., Zhang, W., Ru, Y., Liu, X., Li, Ying, Xin, Y., Gao, H., Xie, X., Gao, Y., 2021. A mitophagy inhibitor targeting p62 attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Letters* 510, 24–36. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.04.003>

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., Levine, B., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676. <https://doi.org/10.1038/45257>

Lipka, D.B., Hoffmann, L.S., Heidel, F., Markova, B., Blum, M.-C., Breitenbuecher, F., Kasper, S., Kindler, T., Levine, R.L., Huber, C., Fischer, T., 2008. LS104, a non-ATP-competitive small-molecule inhibitor of JAK2, is potently inducing apoptosis in *JAK2V617F*-positive cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 1176–1184. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2215>

Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M.W., Levine, R.L., Xu, H., Tefferi, A., Deblasio, A., Hatlen, M., Menendez, S., Nimer, S.D., 2011. JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell* 19, 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.12.020>

Liu, X.-J., Wang, L.-N., Zhang, Z.-H., Liang, C., Li, Y., Luo, J.-S., Peng, C.-J., Zhang, X.-L., Ke, Z.-Y., Huang, L.-B., Tang, Y.-L., Luo, X.-Q., 2020. Arsenic trioxide induces autophagic degradation of the FLT3-ITD mutated protein in FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells. *J Cancer* 11, 3476–3482. <https://doi.org/10.7150/jca.29751>

Lock, R., Kenific, C.M., Leidal, A.M., Salas, E., Debnath, J., 2014. Autophagy-Dependent Production of Secreted Factors Facilitates Oncogenic RAS-Driven Invasion. *Cancer Discovery* 4, 466–479. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0841>

López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J.M.P., Madeo, F., Kroemer, G., 2016. Metabolic Control of Longevity. *Cell* 166, 802–821. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.031>

Lorin, S., Pierron, G., Ryan, K.M., Codogno, P., Djavaheri-Mergny, M., 2010. Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signaling pathways in the regulation of autophagy. *Autophagy* 6, 153–154. <https://doi.org/10.4161/auto.6.1.10537>

Lőrincz, P., Juhász, G., 2020. Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology* 432, 2462–2482. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.10.028>

Loscocco, G.G., Vannucchi, A.M., 2022. Role of JAK inhibitors in myeloproliferative neoplasms: current point of view and perspectives. *Int J Hematol* 115, 626–644. <https://doi.org/10.1007/s12185-022-03335-7>

Lu, J., Kovach, J.S., Johnson, F., Chiang, J., Hodes, R., Lonser, R., Zhuang, Z., 2009. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 11697–11702. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905930106>

Lucas, C.M., Harris, R.J., Giannoudis, A., Copland, M., Slupsky, J.R., Clark, R.E., 2011. Cancerous inhibitor of PP2A (CIP2A) at diagnosis of chronic myeloid leukemia is a critical determinant of disease progression. *Blood* 117, 6660–6668. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304477>

Lundberg, P., Takizawa, H., Kubovcakova, L., Guo, G., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Orkin, S.H., Manz, M.G., Skoda, R.C., 2014. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *Journal of Experimental Medicine* 211, 2213–2230. <https://doi.org/10.1084/jem.20131371>

Lv, K., Jiang, J., Donaghy, R., Riling, C.R., Cheng, Y., Chandra, V., Rozenova, K., An, W., Mohapatra, B.C., Goetz, B.T., Pillai, V., Han, X., Todd, E.A., Jeschke, G.R., Langdon, W.Y., Kumar, S., Hexner, E.O., Band, H., Tong, W., 2017. CBL family E3 ubiquitin ligases control JAK2 ubiquitination and stability in hematopoietic stem cells and myeloid malignancies. *Genes Dev.* 31, 1007–1023. <https://doi.org/10.1101/gad.297135.117>

Machado-Neto, J.A., Coelho-Silva, J.L., Santos, F.P. de S., Scheucher, P.S., Campregher, P.V., Hamerschlag, N., Rego, E.M., Traina, F., 2020. Autophagy inhibition potentiates ruxolitinib-induced apoptosis in JAK2V617F cells. *Invest New Drugs* 38, 733–745. <https://doi.org/10.1007/s10637-019-00812-5>

Machado-Neto, J.A., Fenerich, B.A., Scopim-Ribeiro, R., Eide, C.A., Coelho-Silva, J.L., Dechandt, C.R.P., Fernandes, J.C., Rodrigues Alves, A.P.N., Scheucher, P.S., Simões, B.P., Alberici, L.C., de Figueiredo Pontes, L.L., Tognon, C.E., Druker, B.J., Rego, E.M., Traina, F., 2018. Metformin exerts multitarget antileukemia activity in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Cell Death Dis* 9, 311. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0256-4>

Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F., Kroemer, G., 2018. Spermidine in health and disease. *Science* 359, eaan2788. <https://doi.org/10.1126/science.aan2788>

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., Kroemer, G., 2007. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrm2239>

Martina, J.A., Puertollano, R., 2018. Protein phosphatase 2A stimulates activation of TFEB and TFE3 transcription factors in response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 293, 12525–12534. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003471>

Martinez-Lopez, N., Athonvarangkul, D., Mishall, P., Sahu, S., Singh, R., 2013. Autophagy proteins regulate ERK phosphorylation. *Nat Commun* 4, 2799. <https://doi.org/10.1038/ncomms3799>

Marty, C., Lacout, C., Droin, N., Le Couédic, J.-P., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., Plo, I., 2013. A role for reactive oxygen species in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* 27, 2187–2195. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.102>

Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.-C., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., 2010. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. *Blood* 116, 783–787. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257063>

Marty, C., Saint-Martin, C., Pecquet, C., Grosjean, S., Saliba, J., Mouton, C., Leroy, E., Harutyunyan, A.S., Abgrall, J.-F., Favier, R., Toussaint, A., Solary, E., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., Najman, A., Vainchenker, W., Plo, I., Bellanné-Chantelot, C., 2014. Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* 123, 1372–1383. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-504555>

Marubayashi, S., Koppikar, P., Taldone, T., Abdel-Wahab, O., West, N., Bhagwat, N., Caldas-Lopes, E., Ross, K.N., Gönen, M., Gozman, A., Ahn, J.H., Rodina, A., Ouerfelli, O., Yang, G., Hedvat, C., Bradner, J.E., Chiosis, G., Levine, R.L., 2010. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J Clin Invest* 120, 3578–3593. <https://doi.org/10.1172/JCI42442>

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.-Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelinas, C., DiPaola, R.S., Karantza-Wadsworth, V., White, E., 2009. Autophagy Suppresses Tumorigenesis through Elimination of p62. *Cell* 137, 1062–1075. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.048>

Matsuzawa-Ishimoto, Y., Hwang, S., Cadwell, K., 2018. Autophagy and Inflammation. *Annu Rev Immunol* 36, 73–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053253>

Mazurkiewicz-Munoz, A.M., Argetsinger, L.S., Kouadio, J.-L.K., Stensballe, A., Jensen, O.N., Cline, J.M., Carter-Su, C., 2006. Phosphorylation of JAK2 at Serine 523: a Negative Regulator of JAK2 That Is Stimulated by GrowthHormone and Epidermal Growth Factor. *Mol Cell Biol* 26, 4052–4062. <https://doi.org/10.1128/MCB.01591-05>

Mazzacurati, L., Collins, R.J., Pandey, G., Lambert-Showers, Q.T., Amin, N.E., Zhang, L., Stubbs, M.C., Epling-Burnette, P.K., Koblish, H.K., Reuther, G.W., 2019. The pan-PIM inhibitor INCB053914 displays potent synergy in combination with ruxolitinib in models of MPN. *Blood Advances* 3, 3503–3514. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000260>

Mazzacurati, L., Lambert, Q.T., Pradhan, A., Griner, L.N., Huszar, D., Reuther, G.W., 2015. The PIM inhibitor AZD1208 synergizes with ruxolitinib to induce apoptosis of ruxolitinib sensitive and resistant JAK2-V617F-driven cells and inhibit colony formation of primary MPN cells. *Oncotarget* 6, 40141–40157. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5653>

Memisoglu, G., Eapen, V.V., Yang, Y., Klionsky, D.J., Haber, J.E., 2019. PP2C phosphatases promote autophagy by dephosphorylation of the Atg1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 1613–1620. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817078116>

Mesa, Ruben A., Kiladjan, J.-J., Catalano, J.V., Devos, T., Egyed, M., Hellmann, A., McLornan, D., Shimoda, K., Winton, E.F., Deng, W., Dubowy, R.L., Maltzman, J.D., Cervantes, F., Gotlib, J., 2017. SIMPLIFY-1: A Phase III Randomized Trial of Momelotinib Versus Ruxolitinib in Janus Kinase Inhibitor–Naïve Patients With Myelofibrosis. *JCO* 35, 3844–3850. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.73.4418>

Mesa, R.A., Schaap, N., Vannucchi, A.M., Kiladjan, J.-J., Passamonti, F., Zweegman, S., Talpaz, M., Verstovsek, S., Rose, S., Abraham, P., Lord-Bessen, J., Tang, D., Guo, S., Ye, X., Harrison, C.N., 2021. Patient-reported Effects of Fedratinib, an Oral, Selective Inhibitor of Janus Kinase 2, on Myelofibrosis-related Symptoms and Health-related Quality of Life in the Randomized, Placebo-controlled, Phase III JAKARTA Trial. *Hemasphere* 5, e553. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000553>

Mesa, Ruben A, Vannucchi, A.M., Mead, A., Egyed, M., Szoke, A., Suvorov, A., Jakucs, J., Perkins, A., Prasad, R., Mayer, J., Demeter, J., Ganly, P., Singer, J.W., Zhou, H., Dean, J.P., te Boekhorst, P.A., Nangalia, J., Kiladjan, J.-J., Harrison, C.N., 2017. Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol* 4, e225–e236. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(17\)30027-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(17)30027-3)

Meyer, S.C., 2017. Mechanisms of Resistance to JAK2 Inhibitors in Myeloproliferative Neoplasms. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 31, 627–642. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2017.04.003>

Meyer, S.C., Keller, M.D., Chiu, S., Koppikar, P., Guryanova, O.A., Rapaport, F., Xu, K., Manova, K., Pankov, D., O'Reilly, R.J., Kleppe, M., McKenney, A.S., Shih, A.H., Shank, K., Ahn, J., Papalex, E., Spitzer, B., Socci, N., Viale, A., Mandon, E., Ebel, N., Andraos, R., Rubert, J., Dammasa, E., Romanet, V., Dölemeyer, A., Zender, M., Heinlein, M., Rampal, R., Weinberg, R.S., Hoffman, R., Sellers, W.R., Hofmann, F., Murakami, M., Baffert, F., Gaul, C., Radimerski, T., Levine, R.L., 2015. CHZ868, a Type II JAK2 Inhibitor, Reverses Type I JAK Inhibitor Persistence and Demonstrates Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell* 28, 15–28. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.006>

Miao, L.-J., Huang, F.-X., Sun, Z.-T., Zhang, R.-X., Huang, S.-F., Wang, J., 2014. Stat3 inhibits Beclin 1 expression through recruitment of HDAC3 in nonsmall cell lung cancer cells. *Tumor Biol.* 35, 7097–7103. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1961-6>

Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., Rello-Varona, S., Tailler, M., Menger, L., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Ghiringhelli, F., di Virgilio, F., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2011. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science* 334, 1573–1577. <https://doi.org/10.1126/science.1208347>

Mitou, G., Frentzel, J., Desquesnes, A., Le Gonidec, S., AlSaati, T., Beau, I., Lamant, L., Meggetto, F., Espinos, E., Codogno, P., Brousset, P., Giuriato, S., 2015. Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget* 6, 30149–30164. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4999>

Mitrus, I., Missol-Kolka, E., Plucienniczak, A., Szala, S., 2005. Tumour therapy with genes encoding apoptin and E4orf4. *Anticancer Res* 25, 1087–1090.

Mizushima, N., Levine, B., 2020. Autophagy in Human Diseases. *N Engl J Med* 383, 1564–1576. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2022774>

Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., 2011. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>

Moloney, J.N., Cotter, T.G., 2018. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol* 80, 50–64. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.05.023>

Morad, S.A.F., MacDougall, M.R., Abdelmageed, N., Kao, L.-P., Feith, D.J., Tan, S.-F., Kester, M., Loughran, T.P., Wang, H.-G., Cabot, M.C., 2019. Pivotal role of mitophagy in response of acute myelogenous leukemia to a ceramide-tamoxifen-containing drug regimen. *Exp Cell Res* 381, 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.05.021>

Mortensen, M., Ferguson, D.J.P., Edelman, M., Kessler, B., Morten, K.J., Komatsu, M., Simon, A.K., 2010. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 832–837. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913170107>

Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., W. Jacobsen, S.-E., Kranc, K.R., Simon, A.K., 2011. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *Journal of Experimental Medicine* 208, 455–467. <https://doi.org/10.1084/jem.20101145>

Mortimore, G.E., Ward, W.F., 1976. Behavior of the lysosomal system during organ perfusion. An inquiry into the mechanism of hepatic proteolysis. *Front Biol* 45, 157–184.

Moucadel, V., n.d. Differential STAT5 Signaling by Ligand-dependent and Constitutively Active Cytokine Receptors\* 10.

Mouchel, P.-L., Serhan, N., Betous, R., Farge, T., Saland, E., De Medina, P., Hoffmann, J.-S., Sarry, J.-E., Poirot, M., Silvente-Poirot, S., Récher, C., 2020. Dendrogenin A Enhances Anti-Leukemic Effect of Anthracycline in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers* 12, 2933. <https://doi.org/10.3390/cancers12102933>

Mullally, A., Lane, S.W., Ball, B., Megerdichian, C., Okabe, R., Al-Shahrour, F., Paktinat, M., Haydu, J.E., Housman, E., Lord, A.M., Wernig, G., Kharas, M.G., Mercher, T., Kutok, J.L., Gilliland, D.G., Ebert, B.L., 2010. Physiological Jak2V617F Expression Causes a Lethal Myeloproliferative Neoplasm with Differential Effects on Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cancer Cell* 17, 584–596. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.015>

Murugan, A.K., 2019. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance. *Seminars in Cancer Biology* 59, 92–111. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.003>

Nakatake, M., Monte-Mor, B., Debili, N., Casadevall, N., Ribrag, V., Solary, E., Vainchenker, W., Plo, I., 2012. JAK2V617F negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* 31, 1323–1333. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.313>

Nawrocki, S.T., Han, Y., Visconte, V., Przychodzen, B., Espitia, C.M., Phillips, J., Anwer, F., Advani, A., Carraway, H.E., Kelly, K.R., Sekeres, M.A., Maciejewski, J.P., Carew, J.S., 2019. The novel autophagy inhibitor ROC-325 augments the antileukemic activity of azacitidine. *Leukemia* 33, 2971–2974. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0529-2>

Neubauer, H., Cumano, A., Müller, M., Wu, H., Huffstadt, U., Pfeffer, K., 1998. Jak2 Deficiency Defines an Essential Developmental Checkpoint in Definitive Hematopoiesis. *Cell* 93, 397–409. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81168-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81168-X)

Neviani, P., Santhanam, R., Oaks, J.J., Eiring, A.M., Notari, M., Blaser, B.W., Liu, S., Trotta, R., Muthusamy, N., Gambacorti-Passerini, C., Druker, B.J., Cortes, J., Marcucci, G., Chen, C.-S., Verrills, N.M., Roy, D.C., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., Byrd, J.C., Perrotti, D., 2007. FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 117, 2408–2421. <https://doi.org/10.1172/JCI31095>

Neviani, P., Santhanam, R., Trotta, R., Notari, M., Blaser, B.W., Liu, S., Mao, H., Chang, J.S., Galiotta, A., Uttam, A., Roy, D.C., Valtieri, M., Bruner-Klisovic, R., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., Marcucci, G., Perrotti, D., 2005. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* 8, 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.10.015>

Newberry, K.J., Patel, K., Masarova, L., Luthra, R., Manshouri, T., Jabbour, E., Bose, P., Daver, N., Cortes, J., Kantarjian, H., Verstovsek, S., 2017. Clonal evolution and outcomes in myelofibrosis after ruxolitinib discontinuation. *Blood* 130, 1125–1131. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-783225>

Nguyen, T.D., Shaid, S., Vakhrusheva, O., Koschade, S.E., Klann, K., Thölken, M., Baker, F., Zhang, J., Oellerich, T., Sürün, D., Derlet, A., Haberbosch, I., Eimer, S., Osiewacz, H.D., Behrends, C., Münch, C., Dikic, I., Brandts, C.H., 2019. Loss of the selective autophagy receptor p62 impairs murine myeloid leukemia progression and mitophagy. *Blood* 133, 168–179. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-833475>

Novoa, I., Zeng, H., Harding, H.P., Ron, D., 2001. Feedback Inhibition of the Unfolded Protein Response by GADD34-mediated Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$ . *The Journal of Cell Biology* 153, 11.

Oaks, J.J., Santhanam, R., Walker, C.J., Roof, S., Harb, J.G., Ferenchak, G., Eisfeld, A.-K., Van Brocklyn, J.R., Briesewitz, R., Saddoughi, S.A., Nagata, K., Bittman, R., Caligiuri, M.A., Abdel-Wahab, O., Levine, R., Arlinghaus, R.B., Quintas-Cardama, A., Goldman, J.M., Apperley, J., Reid, A., Milojkovic, D., Ziolo, M.T., Marcucci, G., Ogretmen, B., Neviani, P., Perrotti, D., 2013. Antagonistic activities of the immunomodulator and PP2A-activating drug FTY720 (Fingolimod, Gilenya) in Jak2-driven hematologic malignancies. *Blood* 122, 1923–1934. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-492181>

Obba, S., Hizir, Z., Boyer, L., Selimoglu-Buet, D., Pfeifer, A., Michel, G., Hamouda, M.-A., Gonçalvès, D., Cerezo, M., Marchetti, S., Rocchi, S., Droin, N., Cluzeau, T., Robert, G., Luciano, F., Robaye, B., Foretz, M., Viollet, B., Legros, L., Solary, E., Auberger, P., Jacquelin, A., 2015. The PRKAA1/AMPK $\alpha$ 1 pathway triggers autophagy during CSF1-induced human monocyte differentiation and is a potential target in CMML. *Autophagy* 11, 1114–1129. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034406>

Oh, H.-M., Yu, C.-R., Dambuza, I., Marrero, B., Egwuagu, C.E., 2012. STAT3 Protein Interacts with Class O Forkhead Transcription Factors in the Cytoplasm and Regulates Nuclear/Cytoplasmic Localization of FoxO1 and FoxO3a Proteins in CD4+ T Cells. *Journal of Biological Chemistry* 287, 30436–30443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.359661>

Ory, S., Zhou, M., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Morrison, D.K., 2003. Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* 13, 1356–1364. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00535-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00535-9)

Osawa, T., 2019. Atg2 mediates direct lipid transfer between membranes for autophagosome formation. *Molecular Biology* 26, 12.

Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Lujic, M., Samali, A., Gorman, A.M., 2016. The integrated stress response. *EMBO Rep* 17, 1374–1395. <https://doi.org/10.15252/embr.201642195>

Pallas, D.C., Shahrik, L.K., Martin, B.L., Jaspers, S., Miller, T.B., Brautigan, D.L., Roberts, T.M., 1990. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell* 60, 167–176. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90726-U](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90726-U)

Pardanani, A., Tefferi, A., Jamieson, C., Gabrail, N.Y., Lebedinsky, C., Gao, G., Liu, F., Xu, C., Cao, H., Talpaz, M., 2015. A phase 2 randomized dose-ranging study of the JAK2-selective inhibitor fedratinib (SAR302503) in patients with myelofibrosis. *Blood Cancer J* 5, e335. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.63>

Pardanani, A., Tefferi, A., Masszi, T., Mishchenko, E., Drummond, M., Jourdan, E., Vannucchi, A., Jurgutis, M., Ribrag, V., Rambaldi, A., Koh, L.P., Rose, S., Zhang, J., Harrison,



C., 2021. Updated results of the placebo-controlled, phase III JAKARTA trial of fedratinib in patients with intermediate-2 or high-risk myelofibrosis. *Br J Haematol* 195, 244–248. <https://doi.org/10.1111/bjh.17727>

Park, H.J., Li, J., Hannah, R., Biddie, S., Leal-Cervantes, A.I., Kirschner, K., Flores Santa Cruz, D., Sexl, V., Göttgens, B., Green, A.R., 2016. Cytokine-induced megakaryocytic differentiation is regulated by genome-wide loss of a USTAT transcriptional program. *EMBO J* 35, 580–594. <https://doi.org/10.15252/embj.201592383>

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X.H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M.D., Levine, B., 2005. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell* 122, 927–939. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.002>

Pecquet, C., Chachoua, I., Roy, A., Balligand, T., Vertenoil, G., Leroy, E., Albu, R.-I., Defour, J.-P., Nivarthi, H., Hug, E., Xu, E., Ould-Amer, Y., Mouton, C., Colau, D., Vertommen, D., Shwe, M.M., Marty, C., Plo, I., Vainchenker, W., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., 2019. Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *Blood* 133, 2669–2681. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874578>

Pecquet, C., Diaconu, C.C., Staerk, J., Girardot, M., Marty, C., Royer, Y., Defour, J.-P., Dusa, A., Besancenot, R., Giraudier, S., Villeval, J.-L., Knoops, L., Courtoy, P.J., Vainchenker, W., Constantinescu, S.N., 2012. Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood* 119, 4625–4635. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-372524>

Pei, S., Minhajuddin, M., Adane, B., Khan, N., Stevens, B.M., Mack, S.C., Lai, S., Rich, J.N., Inguva, A., Shannon, K.M., Kim, H., Tan, A.-C., Myers, J.R., Ashton, J.M., Neff, T., Pollyea, D.A., Smith, C.A., Jordan, C.T., 2018. AMPK/FIS1-Mediated Mitophagy Is Required for Self-Renewal of Human AML Stem Cells. *Cell Stem Cell* 23, 86-100.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.021>

Pengo, N., Agrotis, A., Prak, K., Jones, J., Ketteler, R., 2017. A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nat Commun* 8, 294. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00303-2>

Pietras, E.M., Reynaud, D., Kang, Y.-A., Carlin, D., Calero-Nieto, F.J., Leavitt, A.D., Stuart, J.M., Göttgens, B., Passegué, E., 2015. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* 17, 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.05.003>

Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D.P., Baracco, E.E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquilot, N., Yamazaki, T., Senovilla, L., Marino, G., Aranda, F., Durand, S., Sica, V., Chery, A., Lachkar, S., Sigl, V., Bloy, N., Buque, A., Falzoni, S., Ryffel, B., Apetoh, L., Di Virgilio, F., Madeo, F., Maiuri, M.C., Zitvogel, L., Levine, B., Penninger, J.M., Kroemer, G., 2016. Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell* 30, 147–160. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.016>

Plo, I., Nakatake, M., Malivert, L., de Villartay, J.-P., Giraudier, S., Villeval, J.-L., Wiesmuller, L., Vainchenker, W., 2008. JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 112, 1402–1412. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134114>

Poillet-Perez, L., Sarry, J.-E., Joffre, C., 2021. Autophagy is a major metabolic regulator involved in cancer therapy resistance. *Cell Reports* 36, 109528. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109528>

Prestipino, A., Emhardt, A.J., Aumann, K., O'Sullivan, D., Gorantla, S.P., Duquesne, S., Melchinger, W., Braun, L., Vuckovic, S., Boerries, M., Busch, H., Halbach, S., Pennisi, S., Poggio, T., Apostolova, P., Veratti, P., Hettich, M., Niedermann, G., Bartholomä, M., Shoumariyeh, K., Jutzi, J.S., Wehrle, J., Dierks, C., Becker, H., Schmitt-Graeff, A., Follo, M., Pfeifer, D., Rohr, J., Fuchs, S., Ehl, S., Hartl, F.A., Minguet, S., Miething, C., Heidel, F.H., Kröger, N., Trivai, I., Brummer, T., Finke, J., Illert, A.L., Ruggiero, E., Bonini, C., Duyster, J., Pahl, H.L., Lane, S.W., Hill, G.R., Blazar, B.R., von Bubnoff, N., Pearce, E.L., Zeiser, R., 2018. Oncogenic JAK2<sup>V617F</sup> causes PD-L1 expression, mediating immune escape in myeloproliferative neoplasms. *Sci. Transl. Med.* 10, eaam7729. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam7729>

Rabellino, A., Andreani, C., Scaglioni, P.P., 2017. The Role of PIAS SUMO E3-Ligases in Cancer. *Cancer Research* 77, 1542–1547. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2958>

Rabinowitz, J.D., White, E., 2010. Autophagy and Metabolism. *Science* 330, 1344–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1193497>

Rao, S., Tortola, L., Perlot, T., Wirnsberger, G., Novatchkova, M., Nitsch, R., Sykacek, P., Frank, L., Schramek, D., Komnenovic, V., Sigl, V., Aumayr, K., Schmauss, G., Fellner, N., Handschuh, S., Glösmann, M., Pasierbek, P., Schleder, M., Resch, G.P., Ma, Y., Yang, H., Popper, H., Kenner, L., Kroemer, G., Penninger, J.M., 2014. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer. *Nat Commun* 5, 3056. <https://doi.org/10.1038/ncomms4056>

Rao, T.N., Hansen, N., Hilfiker, J., Rai, S., Majewska, J.-M., Leković, D., Gezer, D., Andina, N., Galli, S., Cassel, T., Geier, F., Delezie, J., Nienhold, R., Hao-Shen, H., Beisel, C., Di Palma, S., Dimeloe, S., Trebicka, J., Wolf, D., Gassmann, M., Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Handschin, C., Dirnhofer, S., Kröger, N., Hess, C., Radimerski, T., Koschmieder, S., Čokić, V.P., Skoda, R.C., 2019. JAK2-mutant hematopoietic cells display metabolic alterations that can be targeted to treat myeloproliferative neoplasms. *Blood* 134, 1832–1846. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000162>

Rao, T.N., Hansen, N., Stetka, J., Luque Paz, D., Kalmer, M., Hilfiker, J., Ende, M., Ahmed, N., Kubovcakova, L., Rybarikova, M., Hao-Shen, H., Geier, F., Beisel, C., Dirnhofer, S., Schroeder, T., Brümmendorf, T.H., Wolf, D., Koschmieder, S., Skoda, R.C., 2021. JAK2 - V617F and interferon- $\alpha$  induce megakaryocyte-biased stem cells characterized by decreased long-term functionality. *Blood* 137, 2139–2151. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005563>

Ravindran, R., Loebbermann, J., Nakaya, H.I., Khan, N., Ma, H., Gama, L., Machiah, D.K., Lawson, B., Hakimpour, P., Wang, Y.-C., Li, S., Sharma, P., Kaufman, R.J., Martinez, J., Pulendran, B., 2016. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature* 531, 523–527. <https://doi.org/10.1038/nature17186>

Reddy, M.M., Fernandes, M.S., Deshpande, A., Weisberg, E., Inguilizian, H.V., Abdel-Wahab, O., Kung, A.L., Levine, R.L., Griffin, J.D., Sattler, M., 2012. The JAK2V617F oncogene requires expression of inducible phosphofructokinase/fructose-bisphosphatase 3 for cell growth and increased metabolic activity. *Leukemia* 26, 481–489. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.225>

Redza-Dutordoir, M., Averill-Bates, D.A., 2021. Interactions between reactive oxygen species and autophagy: Special issue: Death mechanisms in cellular homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1868, 119041. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119041>

Richmond, T.D., Chohan, M., Barber, D.L., 2005. Turning cells red: signal transduction mediated by erythropoietin. *Trends in Cell Biology* 15, 146–155. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.007>

Riffelmacher, T., Clarke, A., Richter, F.C., Stranks, A., Pandey, S., Danielli, S., Hublitz, P., Yu, Z., Johnson, E., Schwerd, T., McCullagh, J., Uhlig, H., Jacobsen, S.E.W., Simon, A.K., 2017. Autophagy-Dependent Generation of Free Fatty Acids Is Critical for Normal Neutrophil Differentiation. *Immunity* 47, 466-480.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.08.005>

Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R.T., Lemasters, J.J., 2006. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* 2, 39–46. <https://doi.org/10.4161/auto.2229>

Ron, D., 2002. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J. Clin. Invest.* 110, 1383–1388. <https://doi.org/10.1172/JCI0216784>

Royer, Y., Staerk, J., Costuleanu, M., Courtoy, P.J., Constantinescu, S.N., 2005. Janus Kinases Affect Thrombopoietin Receptor Cell Surface Localization and Stability. *Journal of Biological Chemistry* 280, 27251–27261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501376200>

Rubinsztein, D.C., Mariño, G., Kroemer, G., 2011. Autophagy and Aging. *Cell* 146, 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.030>

Ruvolo, P.P., Qui, Y.H., Coombes, K.R., Zhang, N., Ruvolo, V.R., Borthakur, G., Konopleva, M., Andreeff, M., Kornblau, S.M., 2011. Low expression of PP2A regulatory subunit B55 $\alpha$  is associated with T308 phosphorylation of AKT and shorter complete remission duration in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia* 25, 1711–1717. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.146>

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.-G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., Tanaka, K., Kawai, T., Tsujimura, T., Takeuchi, O., Yoshimori, T., Akira, S., 2008. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 $\beta$  production. *Nature* 456, 264–268. <https://doi.org/10.1038/nature07383>

Salemi, S., Yousefi, S., Constantinescu, M.A., Fey, M.F., Simon, H.-U., 2012. Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells. *Cell Res* 22, 432–435. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.200>

Sandilands, E., Serrels, B., McEwan, D.G., Morton, J.P., Macagno, J.P., McLeod, K., Stevens, C., Brunton, V.G., Langdon, W.Y., Vidal, M., Sansom, O.J., Dikic, I., Wilkinson, S., Frame, M.C., 2012a. Autophagic targeting of Src promotes cancer cell survival following reduced FAK signalling. *Nat Cell Biol* 14, 51–60. <https://doi.org/10.1038/ncb2386>

Sandilands, E., Serrels, B., Wilkinson, S., Frame, M.C., 2012b. Src-dependent autophagic degradation of Ret in FAK-signalling-defective cancer cells. *EMBO Rep* 13, 733–740. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.92>

Saur, S.J., Sangkhae, V., Geddis, A.E., Kaushansky, K., Hitchcock, I.S., 2010. Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 115, 1254–1263. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-227033>

Schuck, S., 2020. Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *Journal of Cell Science* 133, jcs246322. <https://doi.org/10.1242/jcs.246322>

Schweichel, J.U., Merker, H.J., 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253–266. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>

Segala, G., David, M., de Medina, P., Poirot, M.C., Serhan, N., Vergez, F., Mougel, A., Saland, E., Carayon, K., Leignadier, J., Caron, N., Voisin, M., Cherier, J., Ligat, L., Lopez, F., Noguier, E., Rives, A., Payré, B., Saati, T.A., Lamaziere, A., Despres, G., Lobaccaro, J.-M., Baron, S., Demur, C., de Toni, F., Larrue, C., Boutzen, H., Thomas, F., Sarry, J.-E., Tosolini, M., Picard, D., Record, M., Récher, C., Poirot, M., Silvente-Poirot, S., 2017. Dendrogenin A drives LXR to trigger lethal autophagy in cancers. *Nat Commun* 8, 1903. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01948-9>

Seglen, P.O., Brinchmann, M.F., 2010. Purification of autophagosomes from rat hepatocytes. *Autophagy* 6, 542–547. <https://doi.org/10.4161/auto.6.4.11272>

Serhan, N., Mouchel, P.-L., Medina, P. de, Segala, G., Mougel, A., Saland, E., Rives, A., Lamaziere, A., Despres, G., Sarry, J.-E., Larrue, C., Vergez, F., Largeaud, L., Record, M., Récher, C., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., 2020. Dendrogenin A synergizes with Cytarabine to Kill Acute Myeloid Leukemia Cells In Vitro and In Vivo. *Cancers (Basel)* 12, E1725. <https://doi.org/10.3390/cancers12071725>

Settembre, C., Di Malta, C., Polito, V.A., Arencibia, M.G., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S.U., Huynh, T., Medina, D., Colella, P., Sardiello, M., Rubinsztein, D.C., Ballabio, A., 2011. TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis. *Science* 332, 1429–1433. <https://doi.org/10.1126/science.1204592>

Shen, S., Niso-Santano, M., Adjemian, S., Takehara, T., Malik, S.A., Minoux, H., Souquere, S., Mariño, G., Lachkar, S., Senovilla, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Pierron, G., Maiuri, M.C., Hikita, H., Kroemer, R., Kroemer, G., 2012. Cytoplasmic STAT3 Represses Autophagy by

Inhibiting PKR Activity. *Molecular Cell* 48, 667–680.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.013>

Shi, C.-S., Shenderov, K., Huang, N.-N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., Kehrl, J.H., 2012. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 $\beta$  production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 13, 255–263.  
<https://doi.org/10.1038/ni.2215>

Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A.M., Czaja, M.J., 2009. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131–1135.  
<https://doi.org/10.1038/nature07976>

Skorski, T., 2007. Genomic instability: The cause and effect of BCR/ABL tyrosine kinase. *Curr Hematol Malig Rep* 2, 69–74. <https://doi.org/10.1007/s11899-007-0010-6>

Stanicka, J., Russell, E.G., Woolley, J.F., Cotter, T.G., 2015. NADPH Oxidase-generated Hydrogen Peroxide Induces DNA Damage in Mutant FLT3-expressing Leukemia Cells\*. *Journal of Biological Chemistry* 290, 9348–9361. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.510495>

Stivala, S., Codilupi, T., Brkic, S., Baerenwaldt, A., Ghosh, N., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Dettmer, M.S., Simillion, C., Kaufmann, B.A., Chiu, S., Keller, M., Kleppe, M., Hilpert, M., Buser, A.S., Passweg, J.R., Radimerski, T., Skoda, R.C., Levine, R.L., Meyer, S.C., 2019. Targeting compensatory MEK/ERK activation increases JAK inhibitor efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Journal of Clinical Investigation* 129, 1596–1611.  
<https://doi.org/10.1172/JCI98785>

Stranks, A.J., Hansen, A.L., Panse, I., Mortensen, M., Ferguson, D.J.P., Puleston, D.J., Shenderov, K., Watson, A.S., Veldhoen, M., Phadwal, K., Cerundolo, V., Simon, A.K., 2015. Autophagy Controls Acquisition of Aging Features in Macrophages. *J Innate Immun* 7, 375–391. <https://doi.org/10.1159/000370112>

Strohecker, A.M., Guo, J.Y., Karsli-Uzunbas, G., Price, S.M., Chen, G.J., Mathew, R., McMahon, M., White, E., 2013. Autophagy Sustains Mitochondrial Glutamine Metabolism and Growth of *Braf* V600E–Driven Lung Tumors. *Cancer Discovery* 3, 1272–1285.  
<https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0397>

Strømhaug, P.E., Berg, T.O., Fengsrud, M., Seglen, P.O., 1998. Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochemical Journal* 335, 217–224.  
<https://doi.org/10.1042/bj3350217>

Sui, X., Liang, X., Chen, L., Guo, C., Han, W., Pan, H., Li, X., 2017. Bacterial xenophagy and its possible role in cancer: A potential antimicrobial strategy for cancer prevention and treatment. *Autophagy* 13, 237–247. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1252890>

Sumitomo, Y., Koya, J., Nakazaki, K., Kataoka, K., Tsuruta-Kishino, T., Morita, K., Sato, T., Kurokawa, M., 2016. Cytoprotective autophagy maintains leukemia-initiating cells in murine myeloid leukemia. *Blood* 128, 1614–1624. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-684696>

Sun, N., Malide, D., Liu, J., Rovira, I.I., Combs, C.A., Finkel, T., 2017. A fluorescence-based imaging method to measure in vitro and in vivo mitophagy using mt-Keima. *Nat Protoc* 12, 1576–1587. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.060>

Szczepanek, K., Chen, Q., Larner, A.C., Lesnefsky, E.J., 2012. Cytoprotection by the modulation of mitochondrial electron transport chain: The emerging role of mitochondrial STAT3. *Mitochondrion* 12, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.08.011>

Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y., Takatsu, K., 2002. Enhanced Hematopoiesis by Hematopoietic Progenitor Cells Lacking Intracellular Adaptor Protein, Lnk. *J Exp Med* 195, 151–160. <https://doi.org/10.1084/jem.20011170>

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., Mizushima, N., 2011. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 25, 795–800. <https://doi.org/10.1101/gad.2016211>

Takubo, K., Nagamatsu, G., Kobayashi, C.I., Nakamura-Ishizu, A., Kobayashi, H., Ikeda, E., Goda, N., Rahimi, Y., Johnson, R.S., Soga, T., Hirao, A., Suematsu, M., Suda, T., 2013. Regulation of Glycolysis by Pdk Functions as a Metabolic Checkpoint for Cell Cycle Quiescence in Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>

Tonks, N.K., 2006. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 833–846. <https://doi.org/10.1038/nrm2039>

Torgersen, M.L., Engedal, N., Bøe, S.-O., Hokland, P., Simonsen, A., 2013. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* 122, 2467–2476. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-500629>

Tóthová, Z., Šemeláková, M., Solárová, Z., Tomc, J., Debeljak, N., Solár, P., 2021. The Role of PI3K/AKT and MAPK Signaling Pathways in Erythropoietin Signaling. *IJMS* 22, 7682. <https://doi.org/10.3390/ijms22147682>

Tsukada, M., Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 333, 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)

Ungureanu, D., Saharinen, P., Junntila, I., Hilton, D.J., Silvennoinen, O., 2002. Regulation of Jak2 through the Ubiquitin-Proteasome Pathway Involves Phosphorylation of Jak2 on Y1007 and Interaction with SOCS-1. *Mol Cell Biol* 22, 3316–3326. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.10.3316-3326.2002>

Ungureanu, D., Wu, J., Pekkala, T., Niranjani, Y., Young, C., Jensen, O.N., Xu, C.-F., Neubert, T.A., Skoda, R.C., Hubbard, S.R., Silvennoinen, O., 2011. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol* 18, 971–976. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2099>

Vainchenker, W., Kralovics, R., 2017. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 129, 667–679. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>

Vainchenker, W., Leroy, E., Gilles, L., Marty, C., Plo, I., Constantinescu, S.N., 2018. JAK inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasms and other disorders. *F1000Res* 7, 82. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13167.1>

Van Egeren, D., Escabi, J., Nguyen, M., Liu, S., Reilly, C.R., Patel, S., Kamaz, B., Kalyva, M., DeAngelo, D.J., Galinsky, I., Wadleigh, M., Winer, E.S., Luskin, M.R., Stone, R.M., Garcia, J.S., Hobbs, G.S., Camargo, F.D., Michor, F., Mullally, A., Cortes-Ciriano, I., Hormoz, S., 2021a. Reconstructing the Lineage Histories and Differentiation Trajectories of Individual Cancer Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Cell Stem Cell* 28, 514-523.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.001>

Van Egeren, D., Escabi, J., Nguyen, M., Liu, S., Reilly, C.R., Patel, S., Kamaz, B., Kalyva, M., DeAngelo, D.J., Galinsky, I., Wadleigh, M., Winer, E.S., Luskin, M.R., Stone, R.M., Garcia, J.S., Hobbs, G.S., Camargo, F.D., Michor, F., Mullally, A., Cortes-Ciriano, I., Hormoz, S., 2021b. Reconstructing the Lineage Histories and Differentiation Trajectories of Individual Cancer Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Cell Stem Cell* 28, 514-523.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.001>

van Galen, P., Mbong, N., Kreso, A., Schoof, E.M., Wagenblast, E., Ng, S.W.K., Krivdova, G., Jin, L., Nakauchi, H., Dick, J.E., 2018. Integrated Stress Response Activity Marks Stem Cells in Normal Hematopoiesis and Leukemia. *Cell Reports* 25, 1109-1117.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.10.021>

Vannucchi, A.M., Kiladjian, J.J., Griesshammer, M., Masszi, T., Durrant, S., Passamonti, F., Harrison, C.N., Pane, F., Zachee, P., Mesa, R., He, S., Jones, M.M., Garrett, W., Li, J., Pirron, U., Habr, D., Verstovsek, S., 2015. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *N Engl J Med* 372, 426–435. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409002>

Vazquez de Aldana, C.R., Wek, R.C., Segundo, P.S., Truesdell, A.G., Hinnebusch, A.G., 1994. Multicopy tRNA genes functionally suppress mutations in yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: evidence for separate pathways coupling GCN4 expression to unchanged tRNA. *Mol Cell Biol* 14, 7920–7932.

Velikkakath, A.K.G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., Mizushima, N., 2012. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell* 23, 896–909. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0785>

Venugopal, S., Mascarenhas, J., 2022. The Odyssey of Pacritinib in Myelofibrosis. *Blood Advances* bloodadvances.2022007524. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2022007524>

Verstovsek, Srdan, Courby, S., Griesshammer, M., Mesa, R.A., Brachmann, C.B., Kawashima, J., Maltzman, J.D., Shao, L., Xin, Y., Huang, D., Bajel, A., 2017a. A phase 2 study of momelotinib, a potent JAK1 and JAK2 inhibitor, in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Leukemia Research* 60, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.05.002>

Verstovsek, S., Hoffman, R., Mascarenhas, J., Soria, J.-C., Bahleda, R., McCoon, P., Tang, W., Cortes, J., Kantarjian, H., Ribrag, V., 2015. A phase I, open-label, multi-center study of the JAK2 inhibitor AZD1480 in patients with myelofibrosis. *Leukemia Research* 39, 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2014.11.018>

Verstovsek, Srdan, Mesa, R.A., Gotlib, J., Gupta, V., DiPersio, J.F., Catalano, J.V., Deininger, M.W.N., Miller, C.B., Silver, R.T., Talpaz, M., Winton, E.F., Harvey, J.H., Arcasoy, M.O., Hexner, E.O., Lyons, R.M., Paquette, R., Raza, A., Jones, M., Kornacki, D., Sun, K., Kantarjian, H., 2017b. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol* 10, 55. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0417-z>

Verstovsek, S., Mesa, R.A., Gotlib, J., Levy, R.S., Gupta, V., DiPersio, J.F., Catalano, J.V., Deininger, M., Miller, C., Silver, R.T., Talpaz, M., Winton, E.F., Harvey, J.H., Arcasoy, M.O., Hexner, E., Lyons, R.M., Paquette, R., Raza, A., Vaddi, K., Erickson-Viitanen, S., Koumenis, I.L., Sun, W., Sandor, V., Kantarjian, H.M., 2012. A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis. *N Engl J Med* 366, 799–807. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110557>

Verstovsek, Srdan, Mesa, R.A., Salama, M.E., Li, L., Pitou, C., Nunes, F.P., Price, G.L., Giles, J.L., D'Souza, D.N., Walgren, R.A., Prchal, J.T., 2017c. A phase 1 study of the Janus kinase 2 (JAK2)V617F inhibitor, gandotinib (LY2784544), in patients with primary myelofibrosis, polycythemia vera, and essential thrombocythemia. *Leuk Res* 61, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.08.010>

Verstovsek, S., Talpaz, M., Ritchie, E., Wadleigh, M., Odenike, O., Jamieson, C., Stein, B., Uno, T., Mesa, R.A., 2017. A phase I, open-label, dose-escalation, multicenter study of the JAK2 inhibitor NS-018 in patients with myelofibrosis. *Leukemia* 31, 393–402. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.215>

Verstovsek, S., Tam, C.S., Wadleigh, M., Sokol, L., Smith, C.C., Bui, L.A., Song, C., Clary, D.O., Olszynski, P., Cortes, J., Kantarjian, H., Shah, N.P., 2014. Phase I evaluation of XL019, an oral, potent, and selective JAK2 inhibitor. *Leuk Res* 38, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2013.12.006>

Virshup, D.M., Shenolikar, S., 2009. From Promiscuity to Precision: Protein Phosphatases Get a Makeover. *Molecular Cell* 33, 537–545. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.015>

Waibel, M., Solomon, V.S., Knight, D.A., Ralli, R.A., Kim, S.-K., Banks, K.-M., Vidacs, E., Virely, C., Sia, K.C.S., Bracken, L.S., Collins-Underwood, R., Drenberg, C., Ramsey, L.B., Meyer, S.C., Takiguchi, M., Dickins, R.A., Levine, R., Ghysdael, J., Dawson, M.A., Lock, R.B., Mullighan, C.G., Johnstone, R.W., 2013. Combined Targeting of JAK2 and Bcl-2/Bcl-xL to Cure Mutant JAK2-Driven Malignancies and Overcome Acquired Resistance to JAK2 Inhibitors. *Cell Reports* 5, 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.038>



Walrafen, P., Verdier, F., Kadri, Z., Chrétien, S., Lacombe, C., Mayeux, P., 2005. Both proteasomes and lysosomes degrade the activated erythropoietin receptor. *Blood* 105, 600–608. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-03-1216>

Walz, C., Crowley, B.J., Hudon, H.E., Gramlich, J.L., Neubergh, D.S., Podar, K., Griffin, J.D., Sattler, M., 2006. Activated Jak2 with the V617F Point Mutation Promotes G1/S Phase Transition. *Journal of Biological Chemistry* 281, 18177–18183. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600064200>

Wang, S.S., Esplin, E.D., Li, J.L., Huang, L., Gazdar, A., Minna, J., Evans, G.A., 1998. Alterations of the *PPP2R1B* Gene in Human Lung and Colon Cancer. *Science* 282, 284–287. <https://doi.org/10.1126/science.282.5387.284>

Warr, M.R., Binnewies, M., Flach, J., Reynaud, D., Garg, T., Malhotra, R., Debnath, J., Passegué, E., 2013. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature* 494, 323–327. <https://doi.org/10.1038/nature11895>

Watson, C.J., Papula, A.L., Poon, G.Y.P., Wong, W.H., Young, A.L., Druley, T.E., Fisher, D.S., Blundell, J.R., 2020. The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science* 367, 1449–1454. <https://doi.org/10.1126/science.aay9333>

Wegrzyn, J., Potla, R., Chwae, Y.-J., Sepuri, N.B.V., Zhang, Q., Koeck, T., Derecka, M., Szczepanek, K., Szelag, M., Gornicka, A., Moh, A., Moghaddas, S., Chen, Q., Bobbili, S., Cichy, J., Dulak, J., Baker, D.P., Wolfman, A., Stuehr, D., Hassan, M.O., Fu, X.-Y., Avadhani, N., Drake, J.I., Fawcett, P., Lesnfsky, E.J., Larner, A.C., 2009. Function of Mitochondrial Stat3 in Cellular Respiration. *Science* 323, 793–797. <https://doi.org/10.1126/science.1164551>

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., Levine, B., 2008. JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Molecular Cell* 30, 678–688. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.06.001>

Wernig, G., Mercher, T., Okabe, R., Levine, R.L., Lee, B.H., Gilliland, D.G., 2006. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 107, 4274–4281. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4824>

Wierenga, A.T.J., Schepers, H., Moore, M.A.S., Vellenga, E., Schuringa, J.J., 2006. STAT5-induced self-renewal and impaired myelopoiesis of human hematopoietic stem/progenitor cells involves down-modulation of C/EBP $\beta$ . *Blood* 107, 8.

Wierenga, A.T.J., Vellenga, E., Schuringa, J.J., 2008. Maximal STAT5-Induced Proliferation and Self-Renewal at Intermediate STAT5 Activity Levels. *Mol Cell Biol* 28, 6668–6680. <https://doi.org/10.1128/MCB.01025-08>

Williams, N., Lee, J., Mitchell, E., Moore, L., Baxter, E.J., Hewinson, J., Dawson, K.J., Menzies, A., Godfrey, A.L., Green, A.R., Campbell, P.J., Nangalia, J., 2022. Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies. *Nature* 602, 162–168. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04312-6>

Wilmes, S., Hafer, M., Vuorio, J., Tucker, J.A., Winkelmann, H., Löchte, S., Stanly, T.A., Pulgar Prieto, K.D., Poojari, C., Sharma, V., Richter, C.P., Kurre, R., Hubbard, S.R., Garcia, K.C., Moraga, I., Vattulainen, I., Hitchcock, I.S., Piehler, J., 2020. Mechanism of homodimeric cytokine receptor activation and dysregulation by oncogenic mutations. *Science* 367, 643–652. <https://doi.org/10.1126/science.aaw3242>

Wong, P.-M., Feng, Y., Wang, J., Shi, R., Jiang, X., 2015. Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nat Commun* 6, 8048. <https://doi.org/10.1038/ncomms9048>

Wu, W., Tian, W., Hu, Z., Chen, G., Huang, L., Li, W., Zhang, Xingli, Xue, P., Zhou, C., Liu, L., Zhu, Y., Zhang, Xingliang, Li, L., Zhang, L., Sui, S., Zhao, B., Feng, D., 2014. ULK 1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC 1 to regulate mitophagy. *EMBO Rep* 15, 566–575. <https://doi.org/10.1002/embr.201438501>

Xie, M., Lu, C., Wang, J., McLellan, M.D., Johnson, K.J., Wendl, M.C., McMichael, J.F., Schmidt, H.K., Yellapantula, V., Miller, C.A., Ozenberger, B.A., Welch, J.S., Link, D.C., Walter, M.J., Mardis, E.R., Dpersio, J.F., Chen, F., Wilson, R.K., Ley, T.J., Ding, L., 2014. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 20, 1472–1478. <https://doi.org/10.1038/nm.3733>

Yamada, E., Bastie, C.C., Koga, H., Wang, Y., Cuervo, A.M., Pessin, J.E., 2012. Mouse Skeletal Muscle Fiber-Type-Specific Macroautophagy and Muscle Wasting Are Regulated by a Fyn/STAT3/Vps34 Signaling Pathway. *Cell Reports* 1, 557–569. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.03.014>

Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D.E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A.S.W., Mukhopadhyay, S., Lin, E.Y., Parker, S.J., Banh, R.S., Paulo, J.A., Wen, K.W., Debnath, J., Kim, G.E., Mancias, J.D., Fearon, D.T., Perera, R.M., Kimmelman, A.C., 2020. Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 581, 100–105. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2229-5>

Yeasmin, A.M., Waliullah, T.M., Kondo, A., Kaneko, A., Koike, N., Ushimaru, T., 2016. Orchestrated Action of PP2A Antagonizes Atg13 Phosphorylation and Promotes Autophagy after the Inactivation of TORC1. *PLoS One* 11, e0166636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166636>

Yeh, E., Cunningham, M., Arnold, H., Chasse, D., Monteith, T., Ivaldi, G., Hahn, W.C., Stukenberg, P.T., Shenolikar, S., Uchida, T., Counter, C.M., Nevins, J.R., Means, A.R., Sears, R., 2004. A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nat Cell Biol* 6, 308–318. <https://doi.org/10.1038/ncb1110>

Yokoyama, N., Reich, N.C., Miller, W.T., 2001. Involvement of Protein Phosphatase 2A in the Interleukin-3-Stimulated Jak2-Stat5 Signaling Pathway. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 21, 369–378. <https://doi.org/10.1089/107999001750277844>

You, L., Wang, Z., Li, H., Shou, J., Jing, Z., Xie, J., Sui, X., Pan, H., Han, W., 2015. The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy* 11, 729–739. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017192>

Young, A.R.J., Narita, Masako, Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F.J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M., Narita, Masashi, 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev.* 23, 798–803. <https://doi.org/10.1101/gad.519709>

Young, M.M., Takahashi, Y., Khan, O., Park, S., Hori, T., Yun, J., Sharma, A.K., Amin, S., Hu, C.-D., Zhang, J., Kester, M., Wang, H.-G., 2012. Autophagosomal Membrane Serves as Platform for Intracellular Death-inducing Signaling Complex (iDISC)-mediated Caspase-8 Activation and Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 287, 12455–12468. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.309104>

Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E.H., Lenardo, M.J., 2004. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 304, 1500–1502. <https://doi.org/10.1126/science.1096645>

Yu, L., Wan, F., Dutta, S., Welsh, S., Liu, Z., Freundt, E., Baehrecke, E.H., Lenardo, M., 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4952–4957. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511288103>

Yuan, H.-X., Russell, R.C., Guan, K.-L., 2013. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* 9, 1983–1995. <https://doi.org/10.4161/auto.26058>

Zaleskas, V.M., Krause, D.S., Lazarides, K., Patel, N., Hu, Y., Li, S., Van Etten, R.A., 2006. Molecular Pathogenesis and Therapy of Polycythemia Induced in Mice by JAK2 V617F. *PLoS ONE* 1, e18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000018>

Zhan, H., Ciano, K., Dong, K., Zucker, S., 2015. Targeting glutamine metabolism in myeloproliferative neoplasms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 55, 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bcmed.2015.07.007>

Zhu, B.-M., McLaughlin, S.K., Na, R., Liu, J., Cui, Y., Martin, C., Kimura, A., Robinson, G.W., Andrews, N.C., Hennighausen, L., 2008. Hematopoietic-specific Stat5-null mice display microcytic hypochromic anemia associated with reduced transferrin receptor gene expression. *Blood* 112, 2071–2080. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-127480>

Zuo, Q., Liao, L., Yao, Z.-T., Liu, Y.-P., Wang, D.-K., Li, S.-J., Yin, X.-F., He, Q.-Y., Xu, W.-W., 2021. Targeting PP2A with lomitapide suppresses colorectal tumorigenesis through the activation of AMPK/Beclin1-mediated autophagy. *Cancer Letters* 521, 281–293. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.09.010>