



HAL
open science

Mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs

Amandine Tisserand

► **To cite this version:**

Amandine Tisserand. Mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs. Hématologie. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5112 . tel-04598367

HAL Id: tel-04598367

<https://theses.hal.science/tel-04598367>

Submitted on 3 Jun 2024

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

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

Université Paris Cité

École doctorale Hématologie, Oncogénèse et Biothérapies (HOB 561)

Laboratoire U1287 Cellules Souches Hématopoïétiques et Développement
des Hémopathies Myéloïdes

Équipe 2 Des Cellules Souches Hématopoïétiques aux Mégacaryocytes

Mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs

Par Amandine TISSERAND

Thèse de doctorat d'Hématologie

Dirigée par Isabelle PLO

Présentée et soutenue publiquement le 21 octobre 2022

Devant un jury composé de :

Estelle DUPREZ

DR, Aix-Marseille Université

Loïc GARÇON

PU-PH, Université de Picardie Jules-Verne

Lina BENAJIBA

HDR, Université Paris Cité

François GIRODON

PU-PH, Université de Bourgogne

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Isabelle PLO

DR, INSERM U1287, Institut Gustave Roussy

Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord les membres du jury de ma thèse d'avoir accepté d'en faire partie. Merci à **Estelle DUPREZ** et **Loïc GARCON** d'être mes rapporteurs. Merci également à **Lina BENAJIBA** d'avoir accepté d'être examinatrice. Je remercie **François GIRODON** qui fait partie du jury de ma thèse en tant qu'examineur mais qui a également suivi mon parcours durant ces quatre dernières années en participant à mon comité de suivi de thèse tout comme **Sandra PELLEGRINI** et **Françoise PORTEU** que je remercie également.

Merci à toi **Isabelle** de m'avoir accueilli au laboratoire pour mon stage de master 1, de m'avoir fait confiance pour revenir en master 2 et continuer en thèse sur ce même projet. Grâce à toi j'ai pu participer à de nombreux projets et multiplier les collaborations, c'est quelque chose que j'ai trouvé très enrichissant même si ce n'était pas toujours facile.

Merci à **Paul-Henry** et **Gurvan**, j'ai beaucoup apprécié nos échanges pour mieux concilier l'hémato et les mathématiques, grâce à vous on a pu valoriser le travail sur la cohorte. **Gurvan**, merci à toi pour ta patience et tes capacités à vulgariser les mathématiques pour les biologistes mais aussi merci à toi pour tes rapports si longs et si détaillés, je ne doute pas de toi pour l'écriture de ta thèse ! Merci aussi à **Leïla**, **Catherine** et **Alessandro**, la suite du projet OptiMyn est vraiment très intéressant et cette collaboration est très enrichissante. C'est grâce à toi **Alessandro** que nous avons initié cette collaboration, j'ai beaucoup apprécié nos échanges et c'est cool de collaborer avec un ancien thésard du labo (on n'entre pas si facilement à Gustave Roussy mais on en repart jamais vraiment).

Il n'y aurait pas de thèse sur les patients sans les patients, donc merci à tous ceux qui acceptent de se faire prélever pour la recherche, ces échantillons sont si précieux. Merci aux cliniciens qui nous facilitent l'accès aux prélèvements, **Florence PASQUIER**, **Eric SOLARY**, **Bruno CASSINAT**, **Jean-Jacques KILADJIAN**, **Julien LENGLET**, **François GIRODON**. Et surtout **William VAINCHENKER** sans qui tout cela n'aurait pas été si riche en prélèvement, merci à vous également pour votre regard si juste au cours des différentes réunions de labo.

À tous ceux du labo qui apportent une aide de près ou de loin en donnant des conseils pour les manip lors des réunions ou bien pour la vie au labo, **Caroline**, **Iléana**, **Hana**, **Monika**, **Antonio**, **Nathalie**, **Barbara**, **Marie**, **Laure**, **Larissa** merci pour votre aide. **Najet**, toi qui m'as nommé responsable de ta pièce pendant que j'étais en vacances, quelle responsabilité ! **Brahim** pourra témoigner de mes mails si ponctués. J'ai beaucoup apprécié discuter avec toi et te croiser dans les couloirs toujours aussi coquette, notre petite pin-up du labo.

Merci aussi aux deux paires de mains qu'on ne voit que très tôt le matin, tels de petits lutins qui prennent soin de la vie au labo. Merci **Laurence** et **Soso** pour votre bonne humeur et

votre grande aide, le labo se porterait beaucoup moins bien sans vous. Merci aussi à **Paul, Rama et Mehdi** qui ont gérés toutes les galères administratives.

Matthieu MOSCA, merci de m'avoir appris à faire la plupart des manips que je connais aujourd'hui (enfin quoique... je me serais bien passée de la post PCR même si « c'est pour toi Amandine »). C'est tout de même grâce à toi que j'ai pris goût à rester dans ce labo, même si parfois j'en avais marre de toi haha. Merci aussi aux stagiaires que j'ai encadrés pendant ma thèse et qui m'ont aidé à avancer dans mon projet : **Emilie, Emmanuelle, Alicia, Victoria et Léa**, je suis sûre que la PCR (sous toutes ses formes) n'a plus de secret pour vous... Et sans oublier **Philippe et Cyril**, sans qui toutes mes plaques n'auraient jamais été triées, merci à vous !

Aux anciens jeunes du labo qui était présent quand je suis arrivée et qui m'ont bien accueilli, **Alessandro, Stefania, Graciela, Franscesca, Rameez** et aussi **Séverine BADEL**. Grâce à vous j'ai très vite été intégrée avec une si bonne ambiance. **Brahim** aussi, avec ton sérieux, ton visage si expressif, ta joie de vivre quand tu n'es pas tourmenté par tes IPS aux mille et une mutations. T'es aussi une personne motivante qui sait écouter, un peu violent par contre quand on te fait rire, mon épaule s'en souvient encore.

À tous ceux qui ont quitté le labo avant la fin de ma thèse, **Marco, Mathieu** (avec un seul t), **Suzanna, Yohan**, merci pour votre bonne humeur. Aux jeunes recrues du labo (et je ne parle pas d'âge ...), vous apportez tous votre petite touche et contribuez à une bonne ambiance, merci pour ça, **Léa, Nawa, Elodie, Nasrine, Valentine** et bon courage pour la suite ☺. En particulier **Léa et Nawa**, ce fut un plaisir de commenter vos WB et de vous mettre des chansons dans la tête xoxo... (Ps : gnoomi et sa famille te remercient personnellement **Léa** pour tes petits « poupe » de tous les jours haha).

Mira, j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi, toujours présente pour expliquer les choses, un vrai soutien dans les manips mais aussi d'un point de vue personnelle. Je suis heureuse d'avoir pu apprendre à te connaître, t'es un peu comme une grande sœur, merci pour tout ce que tu m'as apporté au labo et en dehors. Je ne crois pas connaître une personne aussi serviable et généreuse que toi. **Tracy**, très heureuse d'avoir appris à te connaître également, ta douceur, ta joie de vivre... Tu es une personne solaire et tu rends les gens heureux, merci pour tout ça. Quand t'es partis ça m'a beaucoup manqué nos co-voitages en passant par la boulangerie pour nos petits croissants et pain aux chocolats... Mes deux libanaises préférées, très contente de vous compter aujourd'hui parmi mes amis et j'espère pour encore très longtemps.

Jean et Maxime... tellement de choses à dire, Dupond et Dupont, la grande brune et la grande blonde, groot et botruc, vous formez un si jolie couple. Une vraie love story à suivre au laboratoire... Vous m'avez fait beaucoup rire et je vous ai donné aussi beaucoup de

sur nom... **Jean** alias Groot, la grande brune... j'ai surtout appris à te connaître durant les after work et aussi à travers nos échanges musicaux. T'es un bien meilleur musicien que moi, surtout en termes d'impro. C'était sympa... mais je préfère ma place de prof plutôt qu'élève (beaucoup moins stressant) ... Merci aussi pour tes petits post-it qui font une super déco sur mon bureau, je les garderais en souvenir... 😊 **Maxime**, mon coloc, la grande blonde, botruc, robinson, fœtus... il y a tellement de choses pour lesquelles je voudrais te remercier... Tu es quelqu'un de très serviable, le meilleur coloc de bureau qui existe, entre les fous rires, ton aide dans mes problèmes informatiques, ton œil avisé pour mes diapos et la rédaction, ton rire de mouette, nos pauses café, les after work, nos débats, les chansons que l'on sifflait et mettaient dans la tête des autres, tes petits gâteaux pour me remonter le moral. Bon... par contre tu n'es pas doué pour donner des noms aux objets (pauvre pablou peur...). Je sais que je t'ai aussi beaucoup apporté grâce à mes expressions, purée de pom-meu de terre !

Mon petit **Jean-Edouard** alias JE, tu es vraiment quelqu'un de solaire, avec un rire communicateur et avec beaucoup BEAUCOUP d'histoires plus rocambolesques les unes que les autres et surtout un talent fou pour les raconter. Tu as toujours eu une oreille tendue pour écouter mes plaintes et *vice versa*. Merci d'avoir été là aussi, en particulier pendant la rédaction de ma thèse, tu as eu les bonnes paroles pour me booster. J'ai beaucoup apprécié nos échanges aussi sur JAK2 et P53, bon courage pour ta dernière année ! Il y a tellement d'autres choses à dire, mais je m'en tiendrais là ;-).

Agathe, bichette, tu es une personne vraiment fantastique, tu m'as souvent fait rire en pièce Najet ou pour faire les stocks, je me souviendrais à vie de gus-gus (m'insulte pas) mais aussi de ton talent pour attribuer un nom aux objets et tes expressions normandes... et oui pouleto, allez... Boujou ! **Hélène**, toujours là à 7h du mat pendant les grèves et même après 😊. T'es une personne que j'apprécie énormément, très serviable, toujours à l'écoute et gentille même si t'oses penser le contraire. Et surtout merci pour ton franc parlé, on ne voit jamais arriver les punchlines ça fait toujours plaisir mdr. Par-dessus tout, merci les filles pour toutes nos conversations sans filtre autour d'un café ou d'un thé. J'espère vous compter parmi mes amis encore un long moment avec toujours plus de sushi, de cidre normand (brut svp) et d'éclat de rire ! J'ai tellement plus à dire mais vous seules savez et c'est très bien comme ça. Je vous souhaite bon courage pour la fin de votre thèse auxquelles vous avez intérêt à m'inviter, love you girls !

Donia, Aygun et Camélia, on a formé un quatuor d'enfer, on s'est soutenue dans bien des aspects de nos thèses que ce soit pour certaines manips, protocoles, réflexions sur nos sujets, les diapos et dans les moments compliqués. Mais aussi en dehors du contexte pro bien sûr, on a créé un véritable lien d'amitié. J'ai eu énormément de chance de vous rencontrer et de partager tant de chose avec vous entre les rires et les pleurs, ce petit groupe nous a permis d'avancer encore plus loin. Pour tout ça, votre présence et votre soutiens tout au long de la thèse un grand merci. **Donia**, on s'est connu à la fac et nous avons atterri dans le même labo sans même le savoir, je suis contente d'avoir pu partager

toute cette aventure avec toi jusqu'à la fin de ces 4 ans de thèse que l'on finit ensemble. **Aygun**, ah ma coupine ça c'est ma coupine !! JAK JAK, malgré ton double visage (que je suis la seule à avoir décelé mdr) je suis très contente de te compter aujourd'hui parmi mes amis. Tu es vraiment une personne formidable, gentille, serviable, à l'écoute et surtout très drôle, ne change absolument rien. Évites peut-être de faire peur aux gens quand ils sont concentrés à leur bureau, mais continue de m'envoyer des vidéos TikTok ça me fais mourir de rire. **Camélia**, on est arrivée toutes les deux en même temps en master 1 et on ne s'est plus quittée depuis. Tu as été mon binôme dans ce labo pendant toutes ces années sur tellement d'aspect (c'est d'ailleurs un secret pour personne dans le labo où nous avons été très souvent associées). Merci pour tout, tant pour ton aide sur mes diapos in english mais surtout pour les moments drôles qu'on a eu, que ce soit au labo, pendant les cours de piano, devant GoT et tous les autres moments qu'on a passé ensemble qui sont si nombreux. Je te souhaite bon courage pour ton post-doc, mais reviens nous vite quand même !

Une mention très spéciale à **Agathe, Hélène, Mira, Tracy, Jean-Edouard, Brahim, Jean, Maxime, Donia, Aygun** et **Camélia**, à vous tous pour qui j'aimerais tellement en dire plus. Vous êtes des personnes que je n'oublierais jamais. On le sait tous, la thèse est une expérience hyper enrichissante et qui te fais vraiment évoluer, mais c'est aussi une expérience difficile et sans le soutiens de vous tous, ça n'aurait pas été la même expérience.

Il faut quand même que je remercie également des personnes extérieures au labo, car même en dehors, la thèse continue. **Ségolène**, pour tous ces moment à la fac et même après pendant notre thèse, un grand merci. À tous mes amis qui m'ont accompagné pendant toute ma scolarité, qui sont d'un grand soutien et une source de motivation. **Capucine, Ludivine, Benjamin, Estelle, Camille, Manon, Colin** et **Aurélien** que je connais depuis si longtemps maintenant mais toujours présents. **Majid, Nathan, Jennifer** et **Charlotte** qui ne me quitte plus depuis la fac, merci pour tous nos moments ensemble à réviser et aussi toutes les soirées pour décompresser. À vous tous qui m'avez accompagné depuis si longtemps un grand merci pour tout.

Et pour finir, un grand merci à ma famille qui a toujours été présente pour moi et qui a été mon plus grand soutien. À mes frères et sœurs **Elodie, Tony** et **Alex**, mais surtout **Papa** et **Maman** qui occupent la plus grande place dans mon cœur, merci d'avoir été une si grande source d'encouragement tout au long de ma scolarité, vous étiez les premiers à croire en moi et à m'accompagner, pour tout ça un grand merci.

Je dédie ma thèse à **mes neveux** et **nièces**, trop jeunes pour comprendre un mot de tout ça mais qui j'espère auront conscience que dans la vie, à partir du moment où l'on croit en soit et qu'on s'entoure des bonnes personnes, on est capable d'accomplir de grandes choses.

SOMMAIRE

Remerciements	1
Sommaire	5
Liste des illustrations.....	8
Liste des tableaux.....	9
Abréviations	10
Résumé.....	13
Abstract	14
Introduction.....	15
I. Hématopoïèse	15
1. Généralités.....	15
2. Des cellules souches aux progéniteurs hématopoïétiques	16
a. Propriétés des CSH.....	16
b. Caractérisation fonctionnelle des CSH et progéniteurs.....	18
c. Caractéristiques phénotypiques des CSH et progéniteurs : les marqueurs de surfaces.....	20
d. Modèle de l'hématopoïèse du modèle classique au modèle continue.....	21
3. La lignée myéloïde	23
a. Mégacaryopoïèse.....	24
b. Érythropoïèse	24
c. Granulopoïèse.....	25
II. Néoplasmes myéloprolifératifs	26
1. Classification des hémopathies malignes myéloïdes	26
2. Caractéristiques clinico-biologiques des NMP classiques BCR-ABL négatifs	28
a. Thrombocytémie Essentielle (TE)	28
b. Polyglobulie de Vaquez.....	28
c. Myélofibrose primaire (MFP).....	29
3. Caractéristiques moléculaires des NMP	30
a. Janus kinase 2 (JAK2)	31
b. MPL	39
c. La calréticuline (CALR).....	41
d. Rôle de JAK2 ^{V617F} , CALR ^m et MPL ^{W515K,L} sur l'hématopoïèse	47
e. Mutations associées.....	51
III. Traitements	56
1. Traitements conventionnels selon la pathologie	57
a. Polyglobulie de Vaquez (PV)	57
b. Thrombocytémie essentielle (TE)	57
c. Myélofibrose primaire (MFP).....	58
2. L'interféron alpha (IFN α)	60
a. Traitement à l'IFN dans les NMP	60

b.	Signalisation de l'IFN	61
c.	Conséquences de l'IFN α et effet sur les CSH	66
d.	Effet de l'IFN α dans les NMP	69
Objectif		73
Résultats		74
Partie 1	: Étude de l'effet de l'interféron alpha sur les différents compartiments de l'hématopoïèse chez des patients atteints de nmp (Mosca et al. 2021)	74
Partie 2	: Études des mutations associées au cours du traitement à l'interféron alpha chez les patients	89
Introduction		89
Matériels et méthodes		90
Résultats		91
a.	Analyse des mutations associées avant et après traitement à l'IFN α au sein de la cohorte de 48 patients	91
b.	Patient #40 : Évolution de la mutation TP53 ^{V143M} et CALR ^{del34} au cours du traitement à l'IFN α	93
a.	Patient #42 : Évolution de la mutation TET2 ^{S315fs} et CALR ^{del52} au cours du traitement à l'IFN α	96
b.	Patient #31 : Évolution de la mutation TET2 ^{H193fs} et JAK2 ^{V617F} au cours du traitement à l'IFN α	97
c.	Patient #26 : Évolution de la mutation DNMT3A ^{R771x} et JAK2 ^{V617F} au cours du traitement à l'IFN α	98
d.	Évolution de la mutation DNMT3A ^{E463fs} et MPL ^{W515K} au cours du traitement à l'IFN α	101
Partie 3	: Étude de la signalisation de l'interféron dans les lignées cellulaires murines JAK2 ^{V617F} ou CALR ^{del52}	104
Introduction		104
Matériels et méthodes		106
Résultats		110
a.	Effet de l'IFN α sur les lignées Ba/F3 MPL-JAK2 ^{V617F} et CALR ^{del52}	110
b.	Effet de l'IFN α dans les lignées JAK2 ^{V617F} et comparaison en fonction de l'expression d'EPOR et MPL	112
c.	Effet de l'IFN α sur les cellules dérivées de progéniteurs d'un patient muté JAK2 ^{V617F} en comparaison d'un sujet sain	114
d.	Analyses transcriptomiques : comparaison entre patients JAK2 ^{V617F} et contrôles ...	115
Discussion et perspectives		117
I.	Amélioration du modèle mathématique	117
II.	Modélisation multi-échelles de l'hématopoïèse	119
III.	Études des mutations associées et influences sur le traitement à l'IFN α	121
IV.	Effet de JAK2 ^{V617F} et CALR ^m sur la signalisation à l'IFN α	124

V. Étude des combinaisons de traitement à l'IFN α	126
Annexes	129
Annexe n°1	131
Annexe n°2	146
Annexe n°3	159
Annexe n°4	167
Bibliographie	199

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Les différents types de division cellulaire de la CSH	17
Figure 2 : Stades de différenciation des cellules souches hématopoïétiques.	18
Figure 3 : Identifications des CSH et progéniteurs d'après les tests fonctionnels.....	19
Figure 4 : Schéma de l'hématopoïèse Classique et modèles révisés (Laurenti et Göttgens 2018).....	21
Figure 5 : Schéma classique de l'hématopoïèse.....	23
Figure 6 : Classification des NMP selon l'organisation mondiale de la santé	27
Figure 7 : Répartitions des mutations motrices dans les NMP classiques <i>BCR-ABL</i> négatifs ..	30
Figure 8 : Cascade de signalisation récepteur de cytokine/JAK2.....	32
Figure 9 : Structure de la protéine JAK2.....	33
Figure 10 : Structure de la protéine JAK2 et positions des mutations dans les NMP	34
Figure 11 : Rôle de JAK2 ^{V617F} sur les dommages à l'ADN et système de réparation.....	37
Figure 12 : Récepteur MPL et ses mutations dans les NMP	40
Figure 13 : Maturation et contrôle qualité des protéines N-glycosylé dans le RE (Moremen, Tiemeyer, et Nairn 2012)	42
Figure 14 : Structure de la protéine CALR Wild-type et mutée	44
Figure 15 : Mécanisme d'action de CALR ^{del52} (adapté de Pecquet et al. 2019)	46
Figure 16 : Schéma de l'acquisition de la mutation JAK2 ^{V617F} et CALR ^m (Hermange et al. 2022)	50
Figure 17 : Gènes fréquemment mutés et anomalies chromosomiques dans les NMP (Grinfeld et al. 2018)	51
Figure 18 : Voie de signalisation des IFN de type I, II et III (Michalska et al. 2018).....	63
Figure 19 : Les différents niveaux de réponse à l'IFN de type I et II (Michalska et al. 2018)...	65
Figure 20 : Effet de l'IFN α sur les CSH (adapté de Essers et al., 2009).....	67
Figure 21 : Quiescence, un mécanisme de protection des CSH contre l'effet apoptotique de l'IFN (adapté de Pietras et <i>al.</i> , 2014).....	68
Figure 22 : Mécanismes d'éradication des CSH CD41 ^{high} JAK2 ^{V617F} (adapté de Tong et <i>al.</i> , 2021).....	70
Figure 23 : Effets de l'IFN α sur les CSH mutées le modèle mathématique	75
Figure 24 : Mutations motrices et associées dans les cellules matures de patients avant et après traitement à l'IFN α	92
Figure 25 : Mutations associées et motrices, #40 et #42	95
Figure 26 : Mutations associées et motrices, patients #31 et #26	99
Figure 27 : Patient #47, Architectures clonales des mutations DNMT3A ^{E463fs} et MPL ^{W515K} ..	102
Figure 28 : Hypothèses de l'amorçage de la voie de l'IFN α par JAK2 ^{V617F}	105
Figure 29 : Effet de l'IFN α dans les lignées Ba/F3 MPL-JAK2 ^{V617F} et CALR ^{del52}	111
Figure 30 : Effet de l'IFN α dans les lignées JAK2 ^{V617F} selon l'expression ou non des récepteurs EPOR et MPL.....	113

Figure 31 : Effet de l'IFN α sur des cellules primaires d'un patient JAK2 ^{V617F} et d'un sujet sain	115
Figure 32 : Analyses transcriptomiques de progéniteurs CD34 ⁺ de patients JAK2 ^{V617F} et de contrôles sous IFN α	116
Figure 33 : Suivi du statut mutationnel des progéniteurs de patients traités à l'IFN + Ruxolitinib.....	127

Les figures de l'introduction à l'exception des figures 4 et 13 ainsi que les figures 23 et 28 ont été réalisées grâce à BioRender.com

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Expression des marqueurs de surface des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques chez l'Homme	20
Tableau 2 : Classification des néoplasmes myéloïdes selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) (2022)	26
Tableau 3 : Classification des TE selon les facteurs de risques	57
Tableau 4 : Séquences des amorces ADN et des sondes Taqman utilisées pour chaque mutation associée	90
Tableau 5 : Médiane du nombre de colonies analysées par point de suivi pour chaque patient en fonction du type de progéniteurs analysés.....	90

ABRÉVIATIONS

- A** AAS : acide acétylsalicylique
AGM : aorte-gonade-mésonéphros
ARCH : age related clonal hematopoiesis
ASXL1 : additional sex combs like 1
- B** BAX : Bcl-2-associated X protein
BCL-XL : B-cell lymphoma-extra large
BCR-ABL : breakpoint cluster region - Abelson
BFU-E : burst forming unit – érythroïde
- C** CALR : calréticuline
CBL : casitas B-cell lymphoma
CD : cluster de différenciation
CDK : cyclin-dependent kinase
CFC : colony forming cell
CFU : colony forming unit
CFU-E : CFU – erythrocyte
CFU-Eo : CFU – eosinophil
CFU-GEMM : CFU – granulocyte erythrocyte macrophage megakaryocyte
CFU-GM : CFU– granulocyte - monocyte
CFU-MK : CFU – megakaryocyte
CFU-S : CFU - spleen
CHIP : clonale hematopoiesise of indeterminate potential
CLP : common lymphoid progenitors
CMN : cellule mononucléée
CMP : common myeloid progenitor
CN-LOH : copy neutral – Loss of heterozygosity
CSF : colony stimulating factor
CSH : cellule souche hématopoïétique
- D** DDR : DNA damage repair
DNMT3A : DNA methyltransferase 3A
- E** EPO : érythropoïétine
EPOR : récepteur à l'érythropoïétine
ERK : extracellular signal regulated kinase
ERp57 : p57 endoplasmic reticulum oxydoreductase
EZH1/2 : enhancer of zeste homolog 1/2
- F** FDA : agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FLT3 : fms-like tyrosine kinase 3
- G** GAF : gamma activated factor
GAS : gamma IFN activated site
GB : globule blanc
G-CSF : granulocyte colony stimulating factor
G-CSFR : récepteur au G-CSF
GM-CSF : granulocyte monocyte CSF
GMP : progéniteur granulo-monocytaire
GR : globule rouge

- H** HP-1 α : heterochromatin protein 1 alpha
HSP : heat shock protein
HU : hydroxyurée
- I** IDH1/2 : isocitrate dehydrogenase 1/2
IFI : gamma-interferon-inducible protein
IFIT : interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats
IFN : interféron
IFNAR : récepteur de l'interféron de type I
IFNGR : récepteur de l'interféron γ
IFNLR : récepteur de l'interféron de type III
IL : interleukine
IRF : IFN regulator factor
ISGF3 : IFN stimulated gene factor 3
ISRE : IFN stimulated response element
ISRE : interferon-stimulated response element
- J** JAK : janus kinase
JH : JAK homology
- K** KDEL : motif lysine aspartate glutamate leucine
KI : knock in
KO : knock out
- L** LAM : leucémie aigüe myéloïde
LB : lymphocyte B
LCE : Leucémie chronique à éosinophile
LCN : leucémie chronique à neutrophile
LMC : leucémie myéloïde chronique
LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique
LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile
LMO2 : LIM domain only 2
LOH : loss of heterozygosity
LT : lymphocyte T
LTC-IC : long term culture – initiating cell
LT-CSH : cellule souche hématopoïétique à long terme
- M** MAPK : mitogen-activated protein kinase
MDM2 : murine double minute 2
MEP : progéniteur érythro-mégacaryocytaire
MFP : myélofibrose primaire
MIPSSv2 : mutation- and karyotype-enhanced international prognostic scoring system
Mkp : précurseur mégacaryocytaire
MPL : myeloproliferative leukemia virus – récepteur de la TPO
MPP : progéniteur multipotent
MTOR : mechanistic target of rapamycin
MX : myxovirus resistance
- N** NAC : N-acétylcystéine
NGS : next generation sequencing
NK : cellule tueuse naturelle
NM : néoplasme myéloïde

- NMP : néoplasme myéloprolifératif
 NOD/SCID : non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency
- O** OAS : 2'-5'-oligoadenylate synthétase
 OMS : organisation mondiale de la santé
- P** PAMP : motif moléculaire associé aux pathogènes
 PCR : polymerase chain reaction
 Ph : chromosome de Philadelphie
 PI3K : phosphoinositide 3 kinase
 PML : acute promyelocytic leukemia
 PNN : polynucléaire neutrophile
 PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis protein
 PV : polyglobulie de Vaquez
- R** RAF : RAF proto oncogene
 RAS : rate sarcoma virus
 RE : réticulum endoplasmique
 RH : recombinaison homologue
 RHC : réponse hématologique complète
 RMC : rémission moléculaire complète
 RMM : réponse moléculaire mineure
 RMP : réponse moléculaire partielle
 ROS : dérivés réactifs de l'oxygène
 RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
- S** Sca1 : stem cell antigen 1
 SCF : stem cell factor
 SF3B1 : splicing factor 3B subunit 1
 SH2 : src homology 2
 SH2B3 : SH2B adapter protein 3
 SMD : syndrome myélodysplasique
 SNP : single nucleotide polymorphism
 SOCS : suppressor of cytokine signaling
 SRSF2 : serine/arginine-rich splicing factor 2
 STAT : signal transducer and activator of transcription
 ST-CSH : cellule souche hématopoïétique à court terme
- T** TE : thrombocytémie essentielle
 TET2 : ten eleven translocation 2
 TGF : facteur de croissance transformant
 TP53 : tumor protein 53
 TPO : thrombopoïétine
 TRAIL : Tumor necrosis-Related Apoptosis-Inducing Ligand
 TYK2 : tyrosine kinase 2
- U** U2AF1 : U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1
 UPD : disomie uniparentale
 USP18 : Ubiquitin-specific peptidase 18
- W** WGS : Whole genome sequencing

RÉSUMÉ

Mécanisme d'action de l'interféron alpha dans les néoplasmes myéloprolifératifs

Les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) classiques BCR-ABL négatifs sont des maladies du sang clonales et malignes qui regroupent 3 pathologies, la thrombocytémie essentielle, la polyglobulie de Vaquez et la myélofibrose qui est la plus grave. Elles sont dues à des dérégulations au niveau des cellules souches hématopoïétiques induites par des mutations de signalisation activant la voie JAK2/STAT. JAK2^{V617F} est la mutation la plus récurrente mais des mutations dans les gènes codant soit pour le récepteur à la thrombopoïétine MPL soit la calréticuline (CALR) sont aussi retrouvées dans 30-40% des cas. Ces mutations entraînent une hyperproduction des cellules sanguines. Ce sont des maladies qui peuvent évoluer à plus ou moins long terme vers des leucémies aiguës secondaires souvent incurables. L'interféron alpha (IFN α) est l'un des rares traitements qui induit à la fois une normalisation des paramètres sanguins et une diminution des cellules mutées. Le but du projet est de comprendre son mécanisme d'action, pour l'heure inconnu, afin de l'améliorer. En effet, c'est un traitement à long-terme, certains patients répondent mal et d'autres restent résistants. Le premier objectif du projet est de comprendre l'effet de l'IFN α sur les différents compartiments de l'hématopoïèse à partir de patients traités en clinique. Le second objectif a pour but de comprendre les effets de l'IFN α sur la réponse moléculaire en fonction des autres mutations associées. Et enfin, le dernier objectif est d'étudier le mécanisme d'action de l'IFN α en comparant son effet de signalisation en présence de JAK2^{V617F} et de CALR^m. Ceci a été effectué en utilisant une cohorte de patients traités, des cellules primaires de patients et des modèles de lignées cellulaires. Au cours de la thèse, nous avons suivi en prospectif et en longitudinal une cohorte de patients traités et avons développé un modèle mathématique pour suivre les dynamiques des cellules mutées. Ainsi nous avons observé que les patients JAK2^{V617F} répondent mieux que les patients CALR^m et qu'il est préférable d'utiliser des doses élevées d'IFN α chez les patients JAK2^{V617F}. Nous avons aussi inféré que ce traitement induit un épuisement des cellules souches mutées par un processus de différenciation. Nous avons également trouvé que l'IFN α agit de manière différente sur la dynamique des cellules progénitrices portant des mutations additionnelles dans des clones indépendants ou pas. En effet, les mutations modifiant l'épigénétique comme celles de TET2 et DNMT3A semblent plus résistantes à l'IFN α quand elles ne sont pas associées à la mutation motrice. Ceci ouvre la voie à l'identification de certains mécanismes de résistance à l'IFN α . Sur le plan mécanistique nous avons montré que JAK2^{V617F} amorce les effets de l'IFN α de façon plus importante qu'avec CALR^m et continuons à investiguer plus en détail comment réguler ce phénomène. Notre projet a donc contribué à la compréhension du mécanisme utilisé par l'IFN α pour éliminer les cellules souches JAK2^{V617F} et éventuellement CALR^m. Il pourrait permettre à terme de prédire la réponse moléculaire des patients, d'identifier les patients potentiellement résistants et d'améliorer cette thérapie.

Mots clés : IFN α , Néoplasmes myéloprolifératifs (NMP), JAK2^{V617F}, CALR^m

ABSTRACT

Mechanisms of action of interferon alpha in myeloproliferative neoplasms

Classical BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal and malignant blood diseases that include 3 diseases, essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis which is the most severe. They are due to deregulation of hematopoietic stem cells induced by signaling mutations activating the JAK2/STAT pathway. JAK2^{V617F} is the most recurrent mutation, but mutations in the genes encoding the thrombopoietin receptor MPL or calreticulin (CALR) are also found in 30-40% of cases. These mutations lead to an overproduction of blood cells. These diseases can progress in the long term to secondary acute leukemia with dismal prognosis. Interferon alpha (IFN α) is one of the rare treatments that induce both a normalization of blood parameters and a decrease in mutated cells. The aim of the project is to understand its mechanism of action, which is currently unknown, in order to improve it. Indeed, it is a long-term treatment, some patients respond poorly and others remain resistant. The first objective of the project is to understand the effects of IFN α on the different compartments of the hematopoiesis from patients treated in clinic. The second objective is to understand the effects of IFN α on the molecular response according to other associated mutations. And finally, the last objective is to study the mechanism of action of IFN α by comparing the signaling effect of JAK2^{V617F} and CALR^m. This was done using a cohort of treated patients, primary patient cells and cell line models. During the thesis, we prospectively followed a cohort of treated patients and developed a mathematical model to follow the dynamics of mutated cells. We observed that JAK2^{V617F} patients respond better than CALR^m patients and that it is preferable to use high doses of IFN α in JAK2^{V617F} patients. We inferred that this treatment induces depletion of mutated stem cells by a differentiation process. We also found that IFN α acts differently on the dynamics of progenitor cells carrying additional mutations in independent and non-independent clones. Indeed, epigenetic-modifying mutations such as those in TET2 and DNMT3A appear to be more resistant to IFN α when not associated with the driver mutation. This opens the way to identify some mechanisms of IFN α resistance. Mechanistically we have shown that JAK2^{V617F} primes the effects of IFN α to a greater extent than with CALR^m and continue to investigate in more detail how to regulate this phenomenon. Our project has thus contributed to the understanding of the mechanism used by IFN α to eliminate JAK2^{V617F} and eventually CALR^m stem cells. It may ultimately allow us to predict the molecular response of patients, identify potentially resistant patients and improve this therapy.

Keywords: IFN α , Myeloproliferative neoplasms (MPNs), JAK2^{V617F}, CALR^m

INTRODUCTION

I. HÉMATOPOÏÈSE

1. Généralités

Le sang représente 8% de la masse corporelle d'un individu. Il a différentes fonctions comme le transport de nutriments à travers l'organisme ainsi qu'un rôle de prévention des hémorragies et des infections grâce aux éléments figurés du sang. Les cellules qui le composent, comme les globules rouges (GR), les globules blancs (GB), et les plaquettes, ont une durée de vie limitée. Elles doivent donc être renouvelées en permanence. C'est à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) que chaque jour plus de 300 milliards de cellules sanguines sont produites. Pour se faire, les CSH entament un processus appelé hématopoïèse qui permet grâce à des phénomènes de prolifération et de différenciation de donner toutes les cellules circulantes dans le sang. Ainsi, les CSH donnent naissance aux progéniteurs immatures puis aux progéniteurs engagés vers la lignée lymphoïde ou myéloïde, eux-mêmes se différencient ensuite en précurseurs (premières cellules morphologiquement reconnaissables). Enfin ceux-ci entament une dernière phase de maturation en cellule terminale.

Au cours de la vie d'un individu, on distingue deux types de processus, l'hématopoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive au cours de la vie embryonnaire, fœtale puis adulte. L'hématopoïèse primitive a lieu au début du développement embryonnaire dans le sac vitellin. Elle permet la production d'érythroblastes et de macrophages nécessaires à la survie de l'embryon. C'est ensuite au niveau de l'aorte-gonade-mesonephros (AGM) que débute l'hématopoïèse définitive caractérisée par la production des CSH. Ces CSH vont ensuite migrer vers le foie fœtal, prendre place dans la rate puis finir dans la moelle osseuse qui devient la niche principale des CSH tout au long de la vie d'un individu chez l'Homme (Galloway et Zon 2003; Vanuytsel, Steinberg, et Murphy 2019).

2. Des cellules souches aux progéniteurs hématopoïétiques

a. Propriétés des CSH

L'hématopoïèse a été classiquement décrite comme un système hiérarchique et pyramidal où l'on trouve à son sommet les CSH. Ces cellules sont définies par leurs capacités d'autorenouvellement et de multipotence puisqu'elles peuvent donner toutes les cellules hématopoïétiques qui composent le sang. Chez l'Homme on estime que leur nombre varie entre 50 et 250 000 (Lee-Six et al. 2018) et qu'il est maintenu de façon à peu près constante à l'âge adulte.

Les CSH au niveau de la moelle osseuse sont majoritairement quiescentes, c'est-à-dire dans un état de dormance. Elles ne sont pas en cycle et ne se divisent pas. C'est grâce à leur environnement, aux facteurs extrinsèques et intrinsèques qu'elles sont capables de maintenir cet état de quiescence. Certaines cytokines jouent notamment un rôle important dans le maintien en quiescence de ces cellules, c'est le cas du SCF (*Stem Cell Factor*) et de la thrombopoïétine (TPO) (Hong et Natalija 2007). En présence d'autres stimuli (expression de certains gènes, stress, cytokines etc.) la CSH peut entrer en cycle cellulaire et se diviser de façon à produire de nouvelles CSH. En effet, la CSH est capable de produire des cellules filles identiques à elle-même, c'est une de ses caractéristiques principales : l'autorenouvellement. C'est ce qui permet de garder un nombre de CSH constant chez un individu. Elle peut également se différencier en donnant des progéniteurs qui vont perdre en capacité d'autorenouvellement et s'engager un peu plus vers un lignage spécifique. La CSH peut se diviser de trois façons différentes. Elle peut se diviser de façon symétrique en donnant deux cellules filles identiques à la cellule de départ permettant ainsi l'expansion du compartiment de CSH. Elle est capable aussi de se diviser de façon asymétrique en donnant deux cellules filles différentes : l'une identique à la cellule mère, avec des caractéristiques de CSH et l'autre qui est différenciée en progéniteur. De cette façon, la CSH contribue au maintien du compartiment CSH et en même temps à l'hématopoïèse. Enfin, la CSH peut entreprendre au cours du cycle cellulaire une division symétrique en donnant cette fois-ci deux cellules filles différenciées (figure 1) (Morrison et Kimble 2006; Nakamura-Ishizu, Takizawa, et Suda 2014). Deux études récentes chez la souris ont montré que les divisions symétriques indifférenciées prédominent au sein du pool de CSH, représentant 80 à 100 % de toutes les divisions de CSH

(Barile et al. 2020; Ito et al. 2016). Une autre étude récente a pu estimer le nombre de divisions symétriques des CSH par an. En effet, les télomères des CSH se raccourcissent lors de la mitose de 30 à 100 pb par division cellulaire, et constituent donc un moyen d'estimer le nombre de divisions cellulaires qu'une CSH a subies. Ainsi, en analysant la longueur des télomères après séquençage par whole genome sequencing (WGS) de colonies de progéniteurs, Mitchell *et al.* ont estimé le nombre de divisions cellulaires symétriques à 1 ou 2 divisions par an au maximum chez l'Homme (Mitchell et al. 2022).

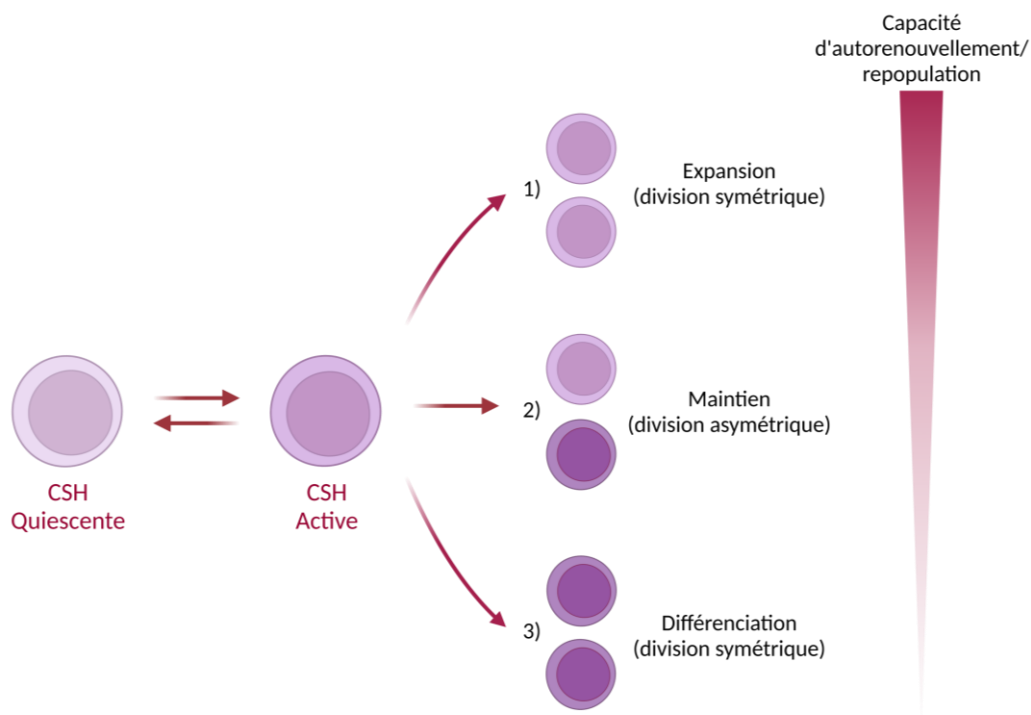


Figure 1 : Les différents types de division cellulaire de la CSH

La CSH quiescente peut devenir active et entreprendre un cycle cellulaire. Elle peut se diviser de trois façons différentes : 1) de façon symétrique en donnant deux CSH, 2) de façon asymétrique en donnant une CSH et un progéniteur multipotent (MPP), 3) de façon symétrique mais en donnant deux cellules différenciées en MPP (Nakamura-Ishizu, Takizawa, et Suda 2014).

Parmi les CSH on distingue deux sous-catégories : les LT-CSH (*Long-term* CSH) et les ST-CSH (*short-term* CSH). Les LT-CSH démontrent la plus grande capacité d'autorenouvellement, ce sont ces cellules qui sont responsables du maintien de l'hématopoïèse tout au long de la vie d'un individu. Elles sont considérées comme majoritairement à l'état de quiescence contrairement aux ST-CSH qui sont actives et ont une plus grande capacité de différenciation (figure 2). Les ST-CSH se distinguent des LT-CSH par une capacité d'autorenouvellement moins importante que les LT-CSH et par conséquent une capacité de repopulation de l'hématopoïèse à plus court terme.

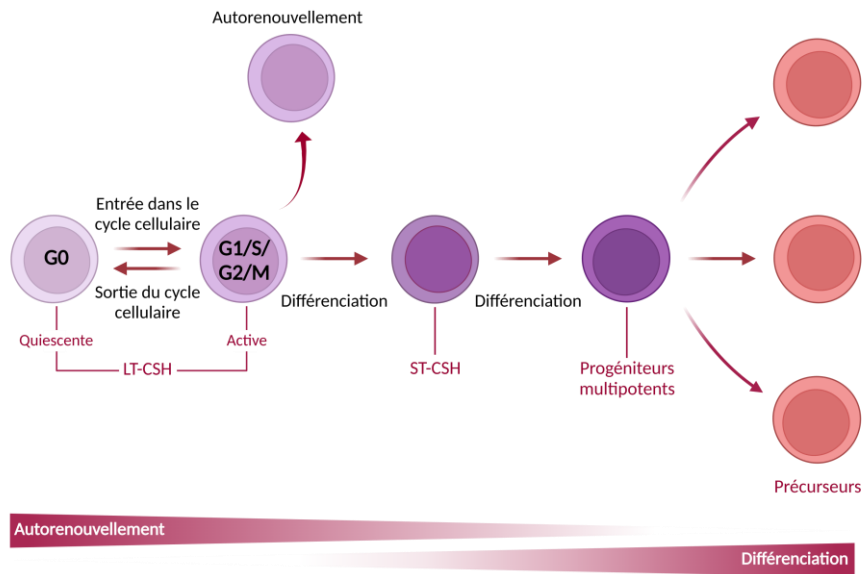


Figure 2 : Stades de différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Les CSH quiescentes entrent en cycle cellulaire et vont se diviser soit pour s'autorenewer soit pour se différencier en CSH capables de contribuer à l'hématopoïèse à plus court terme (ST-CSH). Ces cellules en se différenciant vont donner des progéniteurs multipotents qui vont se différencier vers des progéniteurs puis précurseurs plus engagés vers un lignage.

Les ST-CSH se différencient en progéniteurs hématopoïétiques multipotents (MPP : *Multipotent progenitor*), capables à priori de donner toutes les cellules des lignées lymphoïdes et myéloïdes.

b. Caractérisation fonctionnelle des CSH et progéniteurs

Les CSH et les progéniteurs sont des cellules hétérogènes et sont d'un point de vue morphologique très proche. Ces cellules ont d'abord été identifiées par des tests fonctionnels. En 1961, Till et McCulloch sont les premiers à mettre en évidence ces cellules *via* des tests *in vivo* de greffe de moelle osseuse de souris dans des souris receveuses irradiées de façon létale (Till et McCULLOCH 1950). Grâce à ces expériences ils ont montré que des colonies de cellule s'étaient formées dans la rate provenant de la moelle des souris donneuses qu'ils nomment alors CFU-S (Colony Forming Unit-Spleen).

Quelques années après, Bradley et Metcalf ont réalisé des expériences *in vitro* qui consistent à mettre en culture semi-solide de la moelle de souris en présence de différents substrats. Ils ont ainsi démontré que les cellules provenant de la moelle de ces souris étaient capables de former des colonies et que la pousse de ces cellules qu'ils nomment CFC (Cell forming colony) dépendait de facteurs de croissance appelés CSF (Colony Stimulating Factor)(Bradley et Metcalf 1966).

Par la suite, différents types de progéniteurs ont été décrits selon le type de cellules matures qu'ils sont capables de produire *in vitro* grâce à des tests clonogéniques en milieu semi-solide. Ainsi il a été démontré l'existence de progéniteurs multipotents nommés CFU-GEMM capables de produire des colonies hétérogènes comprenant des granulocytes, des érythrocytes, des macrophages et des mégacaryocytes. Ce type de progéniteurs peut se différencier et donner des progéniteurs plus engagés qui vont être capables de se différencier pour donner les cellules hématopoïétiques matures (figure 3).

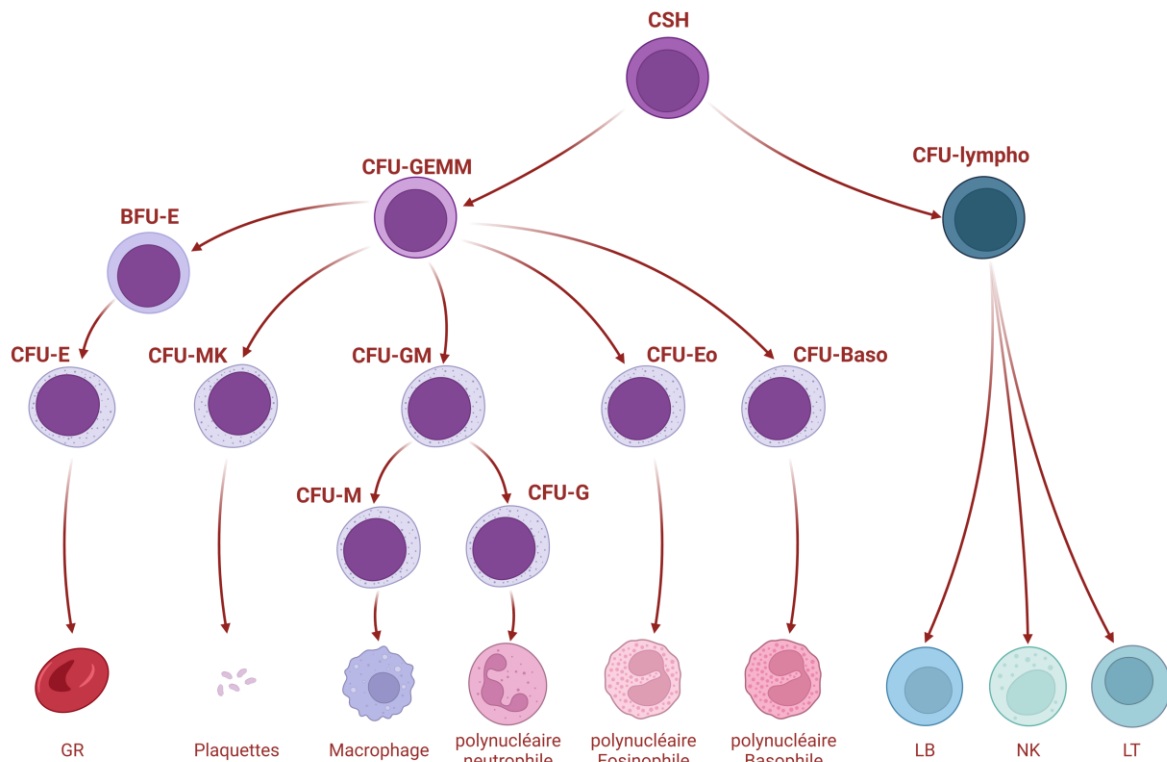


Figure 3 : Identifications des CSH et progéniteurs d'après les tests fonctionnels.

Les CSH sont capables de se différencier pour donner différents progéniteurs multipotents qui vont se différencier pour donner les cellules matures du sang. CSH : cellules souches hématopoïétiques ; CFU : Colony forming Unit ; GEMM : Granulocyte Erythrocyte Macrophage Monocyte ; Lympho : Lymphocyte ; BFU-E : Burst Forming Unit – Erythrocyte ; CFU-E : Erythrocyte ; MK : Mégacaryocyte ; GM : Granulocyte/Monocyte ; M : Monocyte ; G : Granulocyte ; Eo : Eosinophile ; Baso : Basophile ; LB : Lymphocyte B ; NK : Natural Killer ; LT : Lymphocyte T.

Pour caractériser les différents types de progéniteurs et CSH chez l'Homme, les tests fonctionnels sont également utilisés soit en réalisant des cultures à long terme (LTC-IC) ou en greffant des cellules humaines dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID). À travers ces tests fonctionnels, la caractérisation des CSH et progéniteurs se fait *a posteriori*, c'est-à-dire après plusieurs jours/semaines de culture ou après greffe. Bien que ces tests restent une référence, l'utilisation de marqueurs de surface permet de les caractériser plus facilement.

c. Caractéristiques phénotypiques des CSH et progéniteurs : les marqueurs de surfaces

Au cours de la différenciation, les cellules perdent ou acquièrent l'expression de différentes glycoprotéines membranaires appelées CD pour cluster de différenciation. Ainsi, on peut utiliser un certain nombre de marqueurs pour identifier des populations de CSH et progéniteurs selon leurs niveaux de différenciation. Grâce à la cytométrie en flux et à la production d'anticorps monoclonaux, l'expression de ces marqueurs à la surface des cellules est largement utilisée pour les caractériser et étudier les différents types de progéniteurs hématopoïétiques (tableau 1).

Tableau 1 : Expression des marqueurs de surface des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques chez l'Homme

Cellules souches hématopoïétiques (CSH)	CD34 ⁺ , CD90 ⁺ , CD49f ⁺ , CD45RA ⁻ , CD38 ⁻
Progéniteurs multipotents (MPP)	CD34 ⁺ , CD90 ⁻ , CD49f ⁻ , CD45RA ⁻ , CD38 ⁻
Progéniteurs engagés (CMP)	CD34 ⁺ , CD90 ⁻ , CD49f ⁻ , CD45RA ⁻ , CD38 ⁺

Tout d'abord, pour distinguer les progéniteurs, on utilise le marqueur CD34 qui est exprimé à la surface des progéniteurs et des CSH chez l'Homme contrairement aux précurseurs et cellules matures. L'expression de la protéine Thy1 (CD90) (Majeti, Park, et Weissman 2007), permet de discriminer une sous population de CD34⁺ enrichie en CSH (CD34⁺, CD90⁺). Lorsque les cellules se différencient, elles perdent l'expression du CD90 ce qui permet d'identifier une population de progéniteurs plus différenciée (CD34⁺, CD90⁻). Il existe d'autres marqueurs utilisés pour avoir une population riche en CSH, notamment avec l'expression du marqueur CD49f et l'absence d'expression du marqueur CD45. Il reste toutefois difficile d'étudier les CSH directement chez l'Homme étant donné l'absence de marqueurs permettant un enrichissement au-delà de 10 à 20% et leur localisation dans la moelle.

De la même façon, les MPP acquièrent l'expression du marqueur CD38 en se différenciant en progéniteurs engagés. Les progéniteurs engagés vers un lignage ont des caractéristiques différentes bien qu'ils expriment des marqueurs communs (CD34⁺, CD38⁺). Les progéniteurs CD34⁺, CD38⁺ regroupent deux types de progéniteurs : les progéniteurs lymphoïdes communs (*CLP : common lymphoid progenitors*) et les progéniteurs myéloïdes communs (*CMP : common myeloid progenitors*). Ces progéniteurs ont des capacités de différenciation

restreintes par rapport aux MPP et peuvent se différencier comme leur nom l'indique soit vers la lignée lymphoïde soit vers la lignée myéloïde.

d. Modèle de l'hématopoïèse du modèle classique au modèle continue

L'hématopoïèse est étudiée depuis des années et de nombreux travaux ont pour but de caractériser les stades de différenciations qui permettent de passer des CSH aux cellules matures. Grâce aux avancées de la recherche et à l'émergence de nouvelles technologies, le modèle classique de l'hématopoïèse des années 2000 s'est complexifié. Dans ce modèle (figure 4a), la première distinction se fait au niveau des progéniteurs lymphoïdes communs CLP et progéniteurs myéloïdes communs CMP. Les CMP se subdivisent ensuite en progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) ou en progéniteurs granulo-monocytaires (GMP). Dans les années 2005 à 2015, l'identification de nouveaux marqueurs de surface ajoute des stades de différenciation intermédiaires, démontre une hétérogénéité dans les MPP et inclut également une association entre les lignées lymphoïdes et myéloïdes plus tardives dans la différenciation (figure 4b).

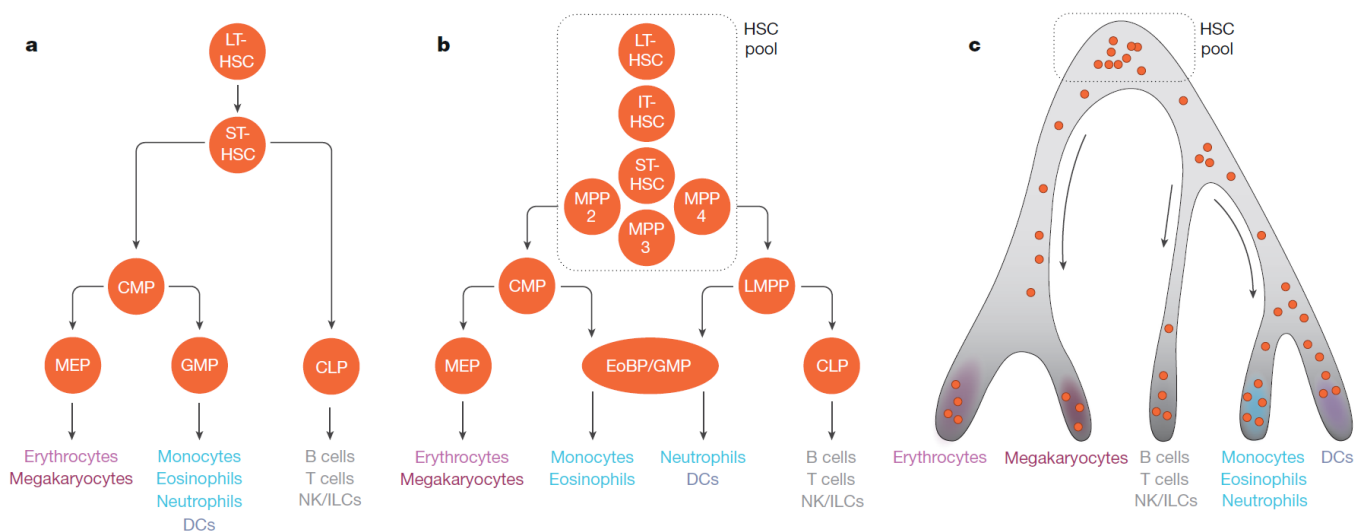


Figure 4 : Schéma de l'hématopoïèse Classique et modèles révisés (Laurenti et Göttgens 2018)

(a) Modèle classique de l'hématopoïèse des années 2000. Chaque population est définie comme un groupe de cellules homogènes avec un potentiel de différenciation et caractéristiques communes. (b) Modèle de l'hématopoïèse des années 2005 à 2015. Ce modèle introduit une population de cellules intermédiaires des CSH (ou HSC) nommée IT-HSC, une hétérogénéité au niveau des MPP (MPP2, MPP3, MPP4) selon leurs biais ou non vers les lignées myéloïdes et lymphoïdes ainsi qu'un branchement commun entre les lignées lymphoïdes et myéloïdes plus tardif (EoBP/GMP). (c) Modèle de différenciation continue de l'hématopoïèse à partir de 2016. Chaque rond orange représente une cellule unique qui prend une trajectoire vers un lignage spécifique en entreprenant un processus de différenciation continue sans démarcation.

Après 2015, l'utilisation de méthodes d'analyse à l'échelon unicellulaire bouleverse les visions précédentes de l'hématopoïèse (Laurenti et Göttgens 2018). D'une part, des études de greffes en dilution limite ou à 1 cellule ont montré qu'il existe une hétérogénéité de CSH capable de générer des lignées différentes comme par exemple des CSH avec des capacités lymphoïdes et myéloïdes différentes ou des CSH biaisées plaquettes (Dykstra et al. 2007; Sanjuan-Pla et al. 2013). D'autre part, ces résultats sont supportés par des études transcriptomiques à l'échelle de la cellule unique (single-cell RNAseq) qui montrent que le compartiment des CSH est une population hétérogène en termes d'expression génique et de trajectoire hématopoïétique. De plus, ces cellules auraient un potentiel de différenciation vers un lignage unique qui à l'échelle du compartiment apparaissent multipotentes. Enfin, la destinée de ces cellules vers un lignage en particulier se ferait sans franchissement de stades majeurs mais *via* un continuum d'états cellulaires corrélés à des changements mineurs d'expression génique. Ainsi ces études fonctionnelles et de profils transcriptomiques à l'échelon unicellulaire permettent de proposer un nouveau modèle dans lequel l'engagement spécifique des CSH vers une lignée serait en réalité un processus continu (figure 4c).

3. La lignée myéloïde

La lignée myéloïde est la lignée cellulaire qui permet la production des GR, des plaquettes, des granulocytes, des monocytes et des macrophages. Les CMP peuvent se différencier en progéniteurs érythro-mégacaryocytaire (MEP) ou en progéniteur granulo-monocytaire (GMP). Les MEP sont des progéniteurs oligopotents, c'est-à-dire qu'ils ont la faculté de se différencier vers deux lignées différentes en présence de facteur de croissance spécifique : la lignée érythrocytaire et la lignée mégacaryocytaire (figure 5).

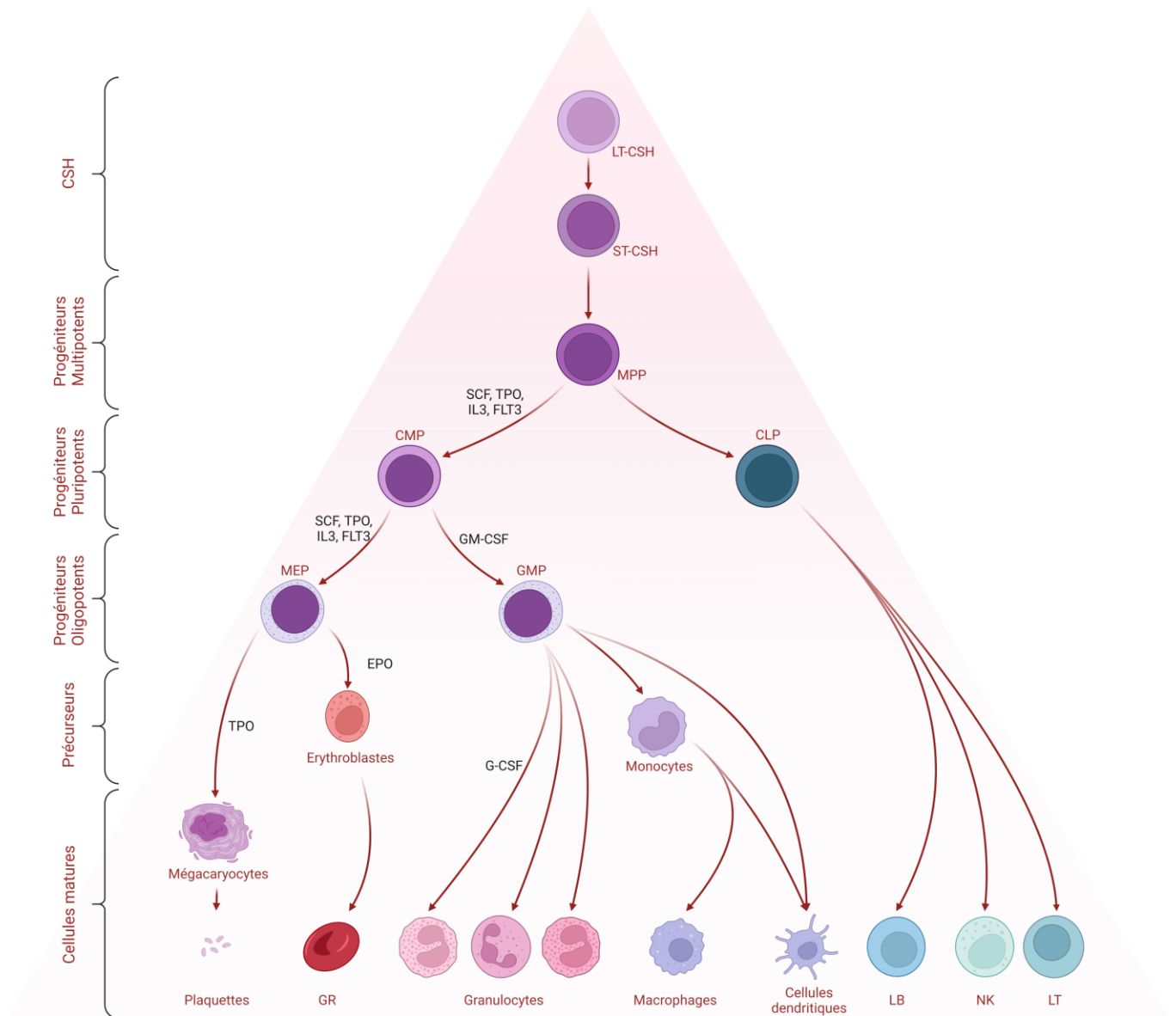


Figure 5 : Schéma classique de l'hématopoïèse

Les CSH se différencient en progéniteurs multipotents (MPP) qui vont se différencier soit vers les lignées myéloïdes (CMP) soit vers les lignées lymphoïdes (CLP). On distingue ces différents types de progéniteurs par cytométrie en flux à l'aide de marqueurs de surface spécifiques (CD34, CD90, CD49, CD38). Grâce à différents facteurs de croissance/cytokines (SCF, TPO, IL3, FLT3, GM-CSF, EPO, G-CSF), les progéniteurs vont s'engager vers un ou plusieurs lignages de façon à produire les cellules matures qui composent le sang.

a. Mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est un processus qui permet la production de plaquettes dans le sang. Ce processus est régulé en grande partie par la TPO, une hormone produite par le foie, qui se fixe sur son récepteur MPL (*myeloproliferative leukemia virus*) et qui permet la différenciation vers la lignée mégacaryocytaire à partir des CSH en passant par les MPP, les CMP, les MEP et le progéniteur mégacaryocytaire (MkP). Les MkP vont ensuite se différencier en mégacaryoblastes et mûrir en mégacaryocyte *via* des processus d'endomitoses successives. Puis les mégacaryocytes vont former des prolongements membranaires ou proplaquettes qui vont se fragmenter en plaquettes à l'aide du flux sanguin. Bien que le schéma classique de l'hématopoïèse définisse la mégacaryopoïèse comme une succession de différenciation de cellules en partant de la CSH *via* les MEP jusqu'aux mégacaryocytes, certains papiers démontrent qu'il y aurait des voies de différenciation alternatives permettant la production de mégacaryocyte plaquetto-gène. Ce processus permettrait directement de passer d'une CSH biaisée mégacaryocytaire vers un mégacaryocyte (Notta et al. 2016; Rodriguez-Fraticelli et al. 2018; Sanjuan-Pla et al. 2013).

b. Érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus conduisant à la production des hématies (ou GR). Elle est largement régulée par l'érythropoïétine (EPO), une cytokine produite de façon plus prépondérante par le rein, qui joue un rôle majeur particulièrement dans les étapes plus tardives de l'érythropoïèse à partir du stade de progéniteurs CFU-E. Les MEP contiennent des progéniteurs érythroblastiques (BFU-E et CFU-E) qui vont d'abord se différencier en précurseurs érythrocytaires ou proérythroblastes. Les proérythroblastes vont entreprendre un certain nombre de divisions cellulaires avec différents stades de différenciation, allant des érythroblastes basophiles aux érythroblastes acidophiles avec accumulation d'hémoglobine. Vient ensuite l'énucléation des érythroblastes appelés réticulocytes qui sont dépourvus de noyau. Ces réticulocytes passent dans le sang et forment les globules rouges qui assurent le transport de l'oxygène dans le sang, des poumons jusqu'aux organes.

c. Granulopoïèse

La granulopoïèse neutrophile est le processus conduisant à la production des cellules polynucléaires neutrophiles (PNN) qui représentent plus de 70% des cellules de la moelle. Comme il a été dit ci-dessus, les CMP peuvent se différencier en MEP mais également en GMP qui sont les progéniteurs communs aux lignées monocytaires et granulocytaires. Ces cellules jouent un rôle important dans l'immunité innée et permettent de combattre les infections par des agents pathogènes étrangers. Les GMP, sous le contrôle du G-CSF, vont se différencier en myéloblastes. C'est la première étape de différenciation propre à la lignée granulocytaire. Au fur et à mesure des étapes de différenciation et de maturation, les cellules acquièrent des granules et vont commencer à fragmenter leurs noyaux. Les myéloblastes diffèrent des progéniteurs par la présence de granules dans le cytoplasme. Ils vont ensuite se différencier en promyélocytes puis en myélocytes qui mûrissent en métamyélocytes (Cowland et Borregaard 2016). Ces derniers donnent naissance après segmentation du noyau aux polynucléaires neutrophiles. La granulopoïèse permet également la génération des polynucléaires basophiles et éosinophiles.

L'hématopoïèse est un processus complexe qui démarre de la CSH pour produire toutes les cellules du sang au cours de la vie d'un individu. Pour cela, la CSH entreprend plusieurs étapes de prolifération et de différenciation qui peuvent se retrouver altérées. Cela peut entraîner des dérégulations de l'hématopoïèse impactant une ou plusieurs lignées hématopoïétiques et conduire à l'apparition d'hémopathies comme pour les néoplasmes myéloïdes et plus précisément les néoplasmes myéloprolifératifs.

II. NÉOPLASMES MYÉLOPROLIFÉRATIFS

1. Classification des hémopathies malignes myéloïdes

Les hémopathies malignes myéloïdes sont des maladies caractérisées par un dysfonctionnement au niveau des CSH qui conduit à une hématopoïèse clonale impactant une ou plusieurs lignées myéloïdes. Ces différentes pathologies sont classées selon des caractéristiques cliniques qui définissent la maladie mais prennent également en compte des biomarqueurs tels que des mutations spécifiques ou bien encore des gènes de fusion. La classification de ces différentes pathologies a été récemment mise à jour selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) et est organisée en 9 catégories (tableau 2) (Khoury et al. 2022).

Tableau 2 : Classification des néoplasmes myéloïdes selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) (2022)

1.	Hématopoïèse clonale (HC)
2.	Néoplasme myéloprolifératif (NMP)
	2.1 Leucémie myéloïde chronique, BCR-ABL1 positive (LMC)
	2.2 Polyglobulie de Vaquez (PV)
	2.3 Thrombocytémie essentielle (TE)
	2.4 Myélofibrose primaire (MFP)
	2.5 Leucémie chronique à neutrophile (LCN)
	2.6 Leucémie chronique à éosinophile (LCE)
	2.7 Leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ)
	2.8 NMP non classé
3.	Mastocytose
	3.1 Mastocytose cutanée
	3.2 Mastocytose systémique
	3.3 Sarcome mastocytaire
4.	Syndrome myélodysplasique (SMD)
5.	NMP/ SMD
	5.1 Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)
	5.2 Myélodysplasique/néoplasme myéloprolifératif à neutrophile
	5.3 Myélodysplasique/néoplasme myéloprolifératif muté <i>SF3B1</i> et thrombocytose
	5.4 MSD/NMP non classé
6.	Leucémie aigüe myéloïde (LAM)
	6.1 LAM avec anomalies génétiques définies (fusion <i>PML::RARA</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> , réarrangement <i>KMT2A</i> , <i>MECOM</i> ...)
	6.2 LAM définie par différenciation (minimal, sans maturation, monocytaire, érythrocytaire ...)
7.	Néoplasme myéloïde secondaire
	7.1 néoplasme myéloïde post-thérapie cytotoxique
	7.2 néoplasme myéloïde associée à des prédispositions germinales
8.	Néoplasme myéloïde/lymphoïde à éosinophile et fusion de gène de tyrosine kinase
9.	Leucémie aigüe à lignage mixte ou ambiguë

En 1951, William Dameshek regroupe la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE), la myélofibrose primaire (MFP) et les érythroleucémies sous le terme de maladies myéloprolifératives (Dameshek 1951). Bien

qu'hétérogènes, ces pathologies sont caractérisées par une hyperprolifération d'un ou plusieurs lignages myéloïdes. Cette catégorie est reprise ensuite par l'OMS sous le nom de syndromes puis néoplasmes myéloprolifératifs avec les mêmes pathologies (exceptée l'érythroleucémie) auxquelles sont ajoutées les leucémies chroniques à neutrophiles (LCN) et à éosinophiles (LCE) ainsi que la leucémie myéomonocytaire juvénile (LMMJ) (figure 6).

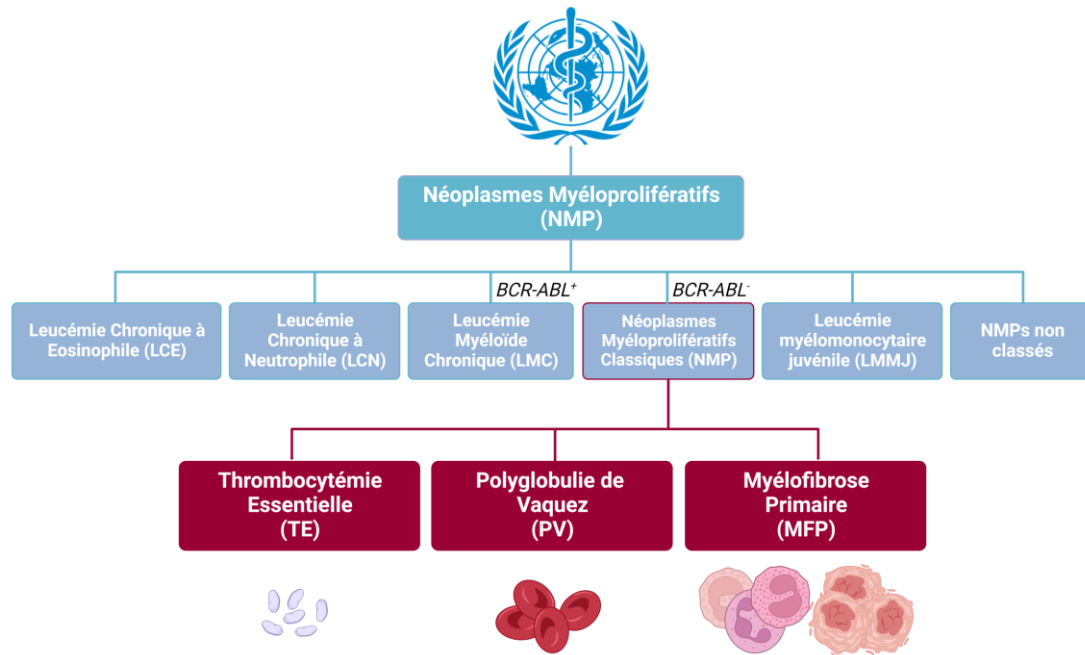


Figure 6 : Classification des NMP selon l'organisation mondiale de la santé

Les NMP comprennent 8 groupes parmi lesquelles on retrouve les NMP classiques BCR-ABL-, la leucémie myéloïde chronique BCR-ABL+ (LMC), la leucémie chronique à éosinophiles (LCE), la leucémie chronique à neutrophiles (LCN), la leucémie myéomonocytaire juvénile (LMMJ), les NMP non classés. Les NMP classiques BCR-ABL- regroupent trois pathologies : la thrombocytémie essentielle (TE), la polyglobulie de Vaquez (PV) et la myélofibrose primaire (MFP). Ces trois pathologies conduisent respectivement à une surproduction de plaquettes, de globules rouges et une dérégulation au niveau des lignées granuleuses et mégacaryocytaires associées à une production de fibres de collagènes dans la moelle dans la PMF.

La première de ces pathologies à avoir été caractérisée est la LMC. En 1960, Peter Nowell et David Hungerford découvrent que les patients atteints de LMC présentent des anomalies chromosomiques résultant de la fusion des bras longs des chromosomes 9 et 22 qu'on appelle communément « chromosome de Philadelphie » en référence à la ville où a été faite la découverte. Cette anomalie chromosomique a été montrée comme responsable de la fusion de deux gènes *BCR* et *ABL* (Faderl et al. 1999). Elle est présente dans plus de 95% des cas de LMC et permet de distinguer les patients atteints de LMC (BCR-ABL positif) des autres NMP classiques (BCR-ABL négatifs) qui regroupent la PV, la TE et la MFP.

2. Caractéristiques clinico-biologiques des NMP classiques BCR-ABL négatifs

Les NMP classiques *BCR-ABL* négatifs sont des hémopathies malignes de la CSH qui vont conduire à leur dérégulation et à la surproduction des cellules matures appartenant à un ou plusieurs lignages myéloïdes (GR, plaquettes, granuleux). Il existe un certain nombre de critères cliniques et biologiques pour distinguer ces différentes pathologies.

a. Thrombocytémie Essentielle (TE)

La thrombocytémie essentielle (TE) est la maladie la moins avancée des trois NMP classiques. C'est aussi la plus fréquente avec environ 50% des patients NMP classiques qui sont atteints de TE. Cette pathologie est caractérisée par une surproduction de plaquettes appelée thrombocytose. Elle est diagnostiquée en moyenne vers l'âge de 60 – 65 ans avec une incidence de 2.3/100 000 personnes/an (Johansson 2006). Les patients atteints de TE peuvent être asymptomatiques ou présenter certains troubles microcirculatoires et vasomoteurs tels que des maux de tête, troubles de la vision, vertiges, des douleurs thoraciques, des fourmillements ou engourdissements. Les patients ont des risques de thromboses artérielles et veineuses qui peuvent entraîner des conséquences neurologiques et cardiaques.

La TE est caractérisée d'un point de vue clinique par une thrombocytose avec un nombre de plaquettes $\geq 450 \times 10^9/L$. L'étude de biopsie de la moelle osseuse permet de révéler une augmentation du nombre de mégacaryocytes de petite taille, matures et à noyau hyperlobulés avec absence de signe de surproduction d'érythrocytes ou de granulocytes (Arber et al. 2016).

b. Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez (PV) représente environ 40% des patients atteints de NMP classiques. Cette pathologie se caractérise par une surproduction de globule rouge GR. Elle est diagnostiquée en moyenne vers l'âge de 60-65 ans avec une incidence de 2.5/100 000 personnes/an. Cette maladie se manifeste par des symptômes pouvant inclure les maux de tête, des étourdissements, des vertiges, des acouphènes ou bien encore des troubles visuels. La PV peut conduire à des complications comme des thromboses artérielles ou veineuses, ainsi qu'à des embolies pulmonaires.

Selon l'OMS, cette pathologie est caractérisée par 3 critères majeurs, notamment un taux d'hémoglobine > 16,5 g/dL chez l'homme et > 16,0 g/dL chez la femme, un taux d'hématocrite supérieur à 49% et 48% respectivement ou encore une augmentation de la masse sanguine ou volume globulaire total (augmentation de plus de 25% comparée à la moyenne normale de prédiction). Le deuxième critère à prendre en compte est l'étude de biopsie de la moelle osseuse pour détecter une hyper-cellularité avec une augmentation des lignées myéloïdes (augmentation des érythrocytes, granulocytes et des mégacaryocytes). Enfin, le dernier critère majeur à prendre en compte pour diagnostiquer la PV, selon l'OMS, est la présence de la mutation $JAK2^{V617F}$ ou $JAK2^{exon12}$ (Arber et al. 2016).

c. Myélofibrose primaire (MFP)

La myélofibrose primaire (MFP) représente 10 % des NMP classiques. C'est la maladie la plus avancée et sévère parmi ces trois pathologies. L'âge au diagnostic est d'environ 60 ans avec une incidence de 1/100 000 personnes/an. Cette pathologie peut affecter plusieurs types cellulaires et conduire à divers symptômes cliniques tels qu'une anémie sévère, pâleur, la présence d'ecchymoses, des thromboses ainsi que fatigue, fièvre ou sueurs nocturnes.

Elle est caractérisée par une prolifération mégacaryocytaire accrue représentée par des mégacaryocytes atypiques, une augmentation de la cellularité dans la moelle osseuse, une augmentation de la prolifération granulocytaire et une diminution de l'érythropoïèse. On distingue deux stades de la maladie, la myélofibrose préfibrotique (pré-MFP) et la myélofibrose (MFP) à proprement dite qui est associée à la présence de fibres de réticuline et de collagène dans la moelle (myélofibrose) conduisant à une hypocellularité de la moelle et à une hématopoïèse extra médullaire. La pré-MFP et la MFP peuvent également être associée à une anémie, une thrombopénie, une leucocytose (leucocytes $\geq 11 \times 10^9/L$), une splénomégalie ainsi qu'une augmentation de lactate déshydrogénase (LDH).

La TE, la PV et la MFP sont des pathologies évolutives c'est-à-dire qu'une TE peut évoluer en PV. De même, 15% des TE et PV évoluent en MFP. Dans de rares cas, la TE et la PV peuvent évoluer en LAM, plus fréquemment les MFP évoluent dans 20-30% à 10 ans des cas en LAM. En plus des différents critères clinico-biologiques précédemment évoqués, la présence de mutations caractéristiques est recherchée pour diagnostiquer ces pathologies.

3. Caractéristiques moléculaires des NMP

En 2005, notre laboratoire a découvert une mutation récurrente dans le gène *JAK2* ($JAK2^{V617F}$) chez les patients atteints de NMP. Par la suite, d'autres mutations acquises ont été décelées dans les gènes de la calréticuline (*CALR*) et *MPL* (Chloé James et al. 2005; Klampfl et al. 2013; Nangalia et al. 2013; Pikman et al. 2006). Ces mutations sont considérées comme les mutations motrices de ces pathologies et sont présentes dans plus de 90% des cas.

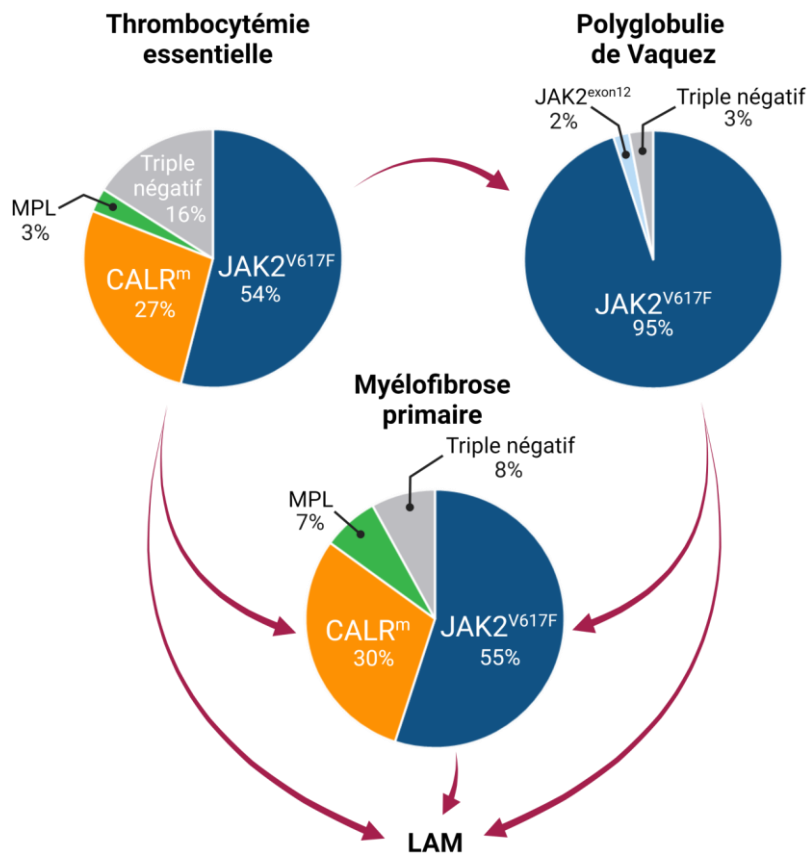


Figure 7 : Répartitions des mutations motrices dans les NMP classiques *BCR-ABL* négatifs

La mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de NMP est la mutation $JAK2^{V617F}$ dans 95% des PV et environ 50% des TE et MFP. On retrouve également des mutations de la calréticuline dans 30% des TE et MFP ainsi que des mutations de *MPL* dans 3% des TE et 7% des MFP. Certains patients ne possèdent aucune mutation dans l'un de ces gènes et sont appelés « triple négatif ». Ces différentes pathologies peuvent évoluer de TE vers la PV, ou MFP et la PV vers la MFP. Ces pathologies peuvent également évoluer dans de rares cas vers une leucémie aigüe myéloïde (LAM).

La mutation $JAK2^{V617F}$ est la mutation la plus fréquente dans les NMP. Elle est présente dans plus de 95% des PV et environ 50 % des TE et MFP. Tandis que dans les TE, $JAK2^{V617F}$ est retrouvée le plus souvent à l'état hétérozygote, les PV présentent des mutations

homozygotes à la suite d'une recombinaison mitotique ; ce clone homozygote s'amplifie dans la MFP (Kralovics et al. 2005) (Scott et al. 2006). Plus rarement, on retrouve des mutations du gène *JAK2* au niveau de l'exon 12 dans les PV. Le gène *CALR* est le deuxième gène le plus fréquemment muté dans environ 30% des TE et MFP. Les mutations de ce gène se situent au niveau de l'exon 9 et correspondent à des délétions ou insertions de bases conduisant à un décalage de lecture d'une paire de base. Les 2 mutations les plus récurrentes sont les mutations *CALR^{del52}* (ou type I) et *CALR^{ins5}* (ou type II). Un certain nombre de mutations (environ 10%) sont dites atypiques. Au total, il existe une cinquantaine de mutations différentes. Dans le cas des TE, les mutations de type I et II sont en proportion équivalente (50% et 40%) tandis que dans la MFP, la mutation *CALR^{del52}* est prédominante (70% des mutations *CALR^m*)(Cabagnols et al. 2015). Des mutations du gène *MPL* sont aussi identifiées dans 3% des TE et 7% des MFP (Tefferi et Pardanani 2015) (figure 7) avec des mutations récurrentes sur le résidu W515A/K/L/R ou plus rarement sur d'autres résidus (S505N, S2014P, Y591N/D).

Il existe des patients qui ne portent pas de mutation motrice des NMP, on dit qu'ils sont « triples négatifs ». On estime ces cas à environ 10%.

a. Janus kinase 2 (JAK2)

i. Fonctions de la protéine JAK2

La protéine JAK2 est une tyrosine kinase appartenant à la famille des Janus kinases qui comprend JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Ces protéines se lient à des récepteurs dépourvus d'activité kinase et permettent ainsi de médier la signalisation induite par la liaison du ligand sur son récepteur. Dans les cellules hématopoïétiques, JAK2 est associée à des récepteurs aux cytokines homodimériques de type 1 tels que le récepteur à la TPO (MPL), le récepteur au G-CSF (G-CSFR) et le récepteur à l'érythropoïétine (EPOR). JAK2 est également capable de se lier à d'autres récepteurs comme le récepteur à l'IL-3, l'IL-5, à la prolactine et aux leptines (Yamaoka et al. 2004) ou des récepteurs aux cytokines de type 2 (IFN γ par exemple). L'association de JAK2 aux récepteurs se fait durant leur maturation dans le réticulum endoplasmique (RE) où JAK2 fait office de chaperonne.

Lorsque le récepteur est en présence de son ligand, il induit soit une homodimérisation, soit des changements conformationnels dans le cas d'homodimères préformés (EPOR ou MPL ou

G-CSFR) ce qui entraîne un rapprochement des protéines JAK2 fixées sur le récepteur. JAK2 va s'autophosphoryler et phosphoryler le récepteur au niveau des résidus tyrosines. La phosphorylation de ces résidus conduit au recrutement de protéines comme les facteurs de transcription STAT (*signal transducer and activator of transcription*). Ces protéines, une fois recrutées au niveau du récepteur, sont phosphorylées par JAK2. Les STAT vont s'homodimériser ou s'hétérodimériser, formant un complexe qui transloque ensuite dans le noyau. Une fois dans le noyau cellulaire, ces facteurs de transcription se fixent sur des promoteurs spécifiques et induisent la transcription de gènes cibles. JAK2 induit le recrutement de protéines impliquées dans la voie JAK/STAT. Il participe également au recrutement et à l'activation des voies PI3K/AKT/MTOR ainsi qu'à la voie des MAP kinases (figure 8). Ces 3 voies de signalisation induisent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire.

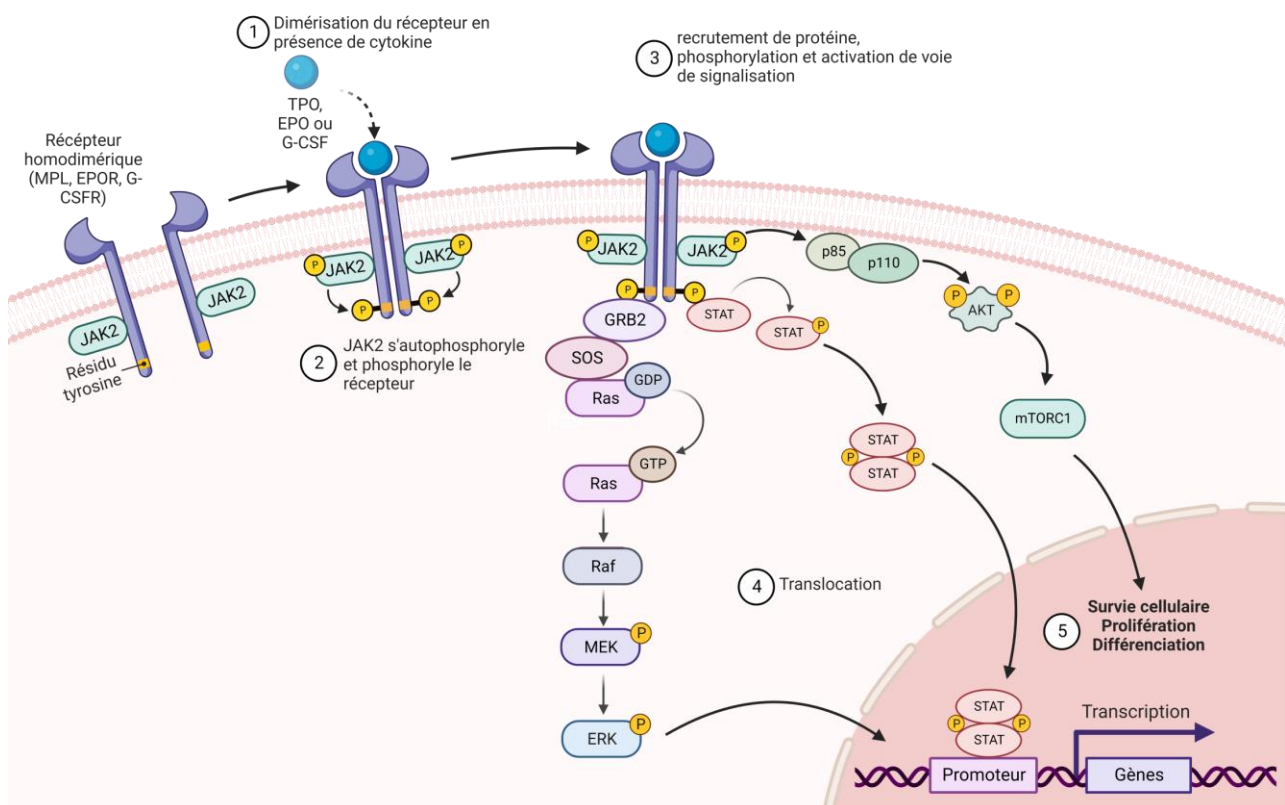


Figure 8 : Cascade de signalisation récepteur de cytokine/JAK2

En présence de cytokine (TPO, EPO ou G-CSF), le récepteur change de conformation et induit ainsi l'activation de JAK2 (1). JAK2 va alors s'autophosphoryler, phosphoryler le récepteur permettant ainsi le recrutement de protéines (2). Ces protéines recrutées au niveau du récepteur vont être phosphorylées par JAK2 et vont induire l'activation des voies de signalisation des MAPK, PI3K/AKT/mTORC1 ainsi que l'activation des facteurs de transcription STAT (STAT1, 2, 3 et 5) (3). Ces protéines vont ensuite transloquer dans le noyau (4) pour induire la transcription de gènes et contribuer ainsi à la prolifération, la différenciation et survie des cellules (5).

ii. Structure de la protéine

JAK2 est composée de domaines Janus homology (JH) conservés entre les différentes protéines de la famille des JAK. Au niveau du domaine N-terminal, la protéine JAK2 porte un domaine FERM (JH5-8) qui permet la fixation aux récepteurs membranaires. JAK2 est dotée d'un domaine « SH2 like » qui permet des interactions protéine-protéine, conduisant au recrutement de partenaires nécessaire à l'activation des voies de signalisation en aval. Le domaine JH1 qui porte un domaine de liaison à l'ATP ainsi qu'un site catalytique permettant l'activité kinase se situe au niveau de la partie C-terminale de la protéine. Cette activité dépend du résidu tyrosine Y1007 qui est phosphorylé lors de l'activation du récepteur lié à JAK2 et qui permet son activation (Feng et al. 1997). Ce domaine confère à cette protéine la capacité de phosphoryler les résidus tyrosines des protéines cibles, ce qui conduit à leurs activations. Ces voies de signalisation sont impliquées dans des processus de prolifération et de différenciation cellulaires qui doivent être déclenchés de façon transitoire et non constitutive. En l'absence de stimulation du récepteur par des cytokines, le domaine pseudokinase (JH2) bloque l'activité kinase de JAK2 (Lindauer et al. 2001, 2). Lorsqu'une cytokine vient se fixer au récepteur, celui-ci change de conformation entraînant la libération du domaine kinase par le domaine pseudokinase. Le domaine pseudokinase permet ainsi de contrôler l'activation de la protéine JAK2 (figure 9). Une fois activée, la protéine peut alors jouer son rôle de phosphorylation et d'activation pour les autres protéines situées en aval.



Figure 9 : Structure de la protéine JAK2

La protéine JAK2 est composée de domaines d'homologies JH1 à JH7. Au niveau de la séquence N-terminale de la protéine, on retrouve le domaine FERM responsable de l'interaction entre JAK2 et un récepteur (MPL, EPOR, G-CSFR). Les domaines JH3 et JH4 sont des domaines d'interactions avec les protéines partenaires. Le domaine JH1 porte l'activité kinase de la protéine et permet la phosphorylation des résidus tyrosines. Enfin, le domaine JH2 est le domaine pseudokinase qui permet d'inhiber l'activité kinase de la protéine.

iii. La mutation $JAK2^{V617F}$

Le gène codant pour la protéine JAK2 se situe au niveau du chromosome 9 (9p24). Il se retrouve muté dans les NMP et génère la protéine mutante $JAK2^{V617F}$. Cette mutation est due à une substitution d'une guanine (G) par une thymine (T) en position 1849 au niveau de l'exon 14 du gène *JAK2* (Chloé James et al. 2005; Kralovics et al. 2005). Elle induit une modification d'une valine par une phénylalanine en position 617 de la séquence protéique (V617F). Cette modification conduit à un changement de conformation de la protéine au niveau du domaine pseudokinase, modifiant l'inhibition exercée sur l'activité kinase de JAK2. Cette mutation « gain de fonction » rend la protéine $JAK2^{V617F}$ constitutivement active. Par conséquent, les cellules mutées sont indépendantes des cytokines ou hypersensibles à celles-ci (figure 10). Les voies de signalisation STAT, ERK et AKT sont constitutivement activées et les processus de différenciation, de prolifération et de survie cellulaire sont donc maintenus en permanence.

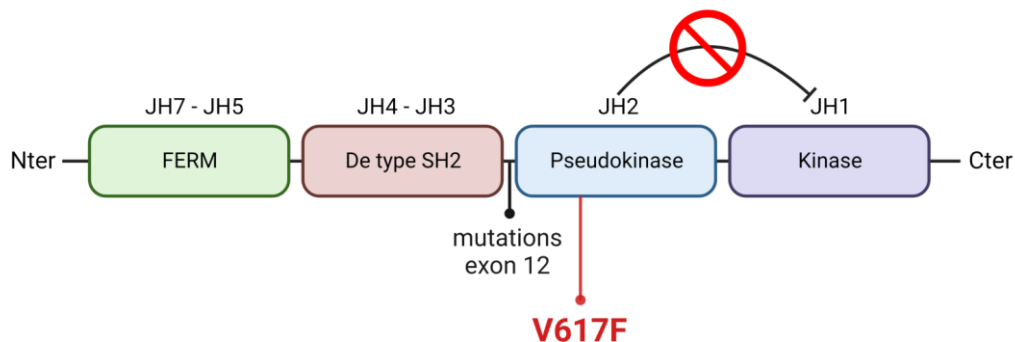


Figure 10 : Structure de la protéine JAK2 et positions des mutations dans les NMP

La mutation $JAK2^{V617F}$ se trouve au niveau de l'exon 14 du gène codant pour cette protéine. Elle contribue à un changement de conformation de la protéine et empêche le domaine pseudokinase d'exercer son rôle d'inhibition du domaine kinase. Les mutations de l'exon 12 se situent à la jonction des domaines de type SH2 et pseudokinase.

La protéine $JAK2^{V617F}$ induit la transformation cellulaire en se fixant aux récepteurs homodimériques de type 1 (MPL, EPOR et G-CSFR) *via* le domaine FERM. Ces récepteurs sont impliqués dans l'hématopoïèse au niveau CSH (MPL), dans l'érythropoïèse (EPOR), la mégacaryopoïèse (MPL) et la granulopoïèse (G-CSFR). L'association de $JAK2^{V617F}$ à ces types de récepteurs explique que cette mutation soit retrouvée dans les 3 maladies (TE, PV et MFP) caractérisées par la surproduction de cellules érythroïdes, mégacaryocytaires et granuleuses (cf. chapitre précédent). Le phénotype prédominant retrouvé peut s'expliquer par l'expression et la stabilité des récepteurs à la surface cellulaire et les effets médiés par

JAK2^{V617F}. Par exemple, MPL est très facilement activable par JAK2^{V617F} et présente une meilleure stabilité à la surface qu'EPOR. Par contre une augmentation d'expression de JAK2^{V617F} (par exemple suite à la recombinaison mitotique) entraîne non plus un effet prolifératif mais au contraire un effet délétère par induction de sénescence *via* MPL (Besancenot et al. 2010). Au contraire, EPOR est très peu stable à la surface et de plus grandes quantités de JAK2^{V617F} sont nécessaires pour l'activer ce qui explique pourquoi on retrouve plus d'homozygotie dans les PV.

De manière intéressante, les niveaux d'activations des STAT diffèrent entre la PV, la TE et la MFP. Dans le cas de la PV, des études ont montré que l'activation de STAT5 est nécessaire pour le développement de la maladie dans des modèles murins (Walz et al. 2012; Yan, Hutchison, et Mohi 2012). Une étude a également montré l'importance des niveaux d'activation de STAT1 pour différencier la PV et la TE. L'étude notamment de colonies BFU-E issues de patients PV et TE mutés JAK2^{V617F} montre que P-STAT5 est préférentiellement exprimée dans le cas des BFU-E de PV tandis que P-STAT1 l'est plutôt dans les BFU-E provenant de TE (Chen et al. 2010, 1).

iv. Autres voies activées par JAK2^{V617F}

En plus des voies de signalisation STAT, MAPK et AKT, la protéine JAK2^{V617F} active d'autres voies de stress cellulaires, de réparation de l'ADN, de modifications épigénétiques ou de résistance à l'apoptose.

Des études ont notamment montré que JAK2^{V617F} induit *via* STAT5 l'expression de BCL-XL, un facteur anti-apoptotique qui est important pour la pousse des progéniteurs érythroïdes (Garçon et al. 2006). Une autre étude a montré le rôle important de la déamidation de BCL-XL qui est inhibée dans les PV et conduit à une inhibition de l'apoptose et des dommages à l'ADN (Zhao et al. 2008).

Des études ont aussi montré que l'expression de JAK2^{V617F} induit dans les lignées cellulaires HEL et Ba/F3 provoque une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi qu'une surexpression de la Cycline D2, une protéine impliquée dans la transition G1/S du cycle cellulaire (Walz et al. 2006). Cette augmentation des ROS a également été observée dans le compartiment des CSH provenant de souris KI JAK2^{V617F} ainsi que chez des patients atteints de NMP (C Marty et al. 2013). Marty *et al.* ont montré que l'accumulation des ROS est médiée par l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT. Le traitement des souris

chimériques greffées avec 30% de cellules de moelle JAK2^{V617F} par N-acétylcystéine (NAC), qui est un antioxydant, conduit à une diminution des ROS mais également une normalisation des paramètres sanguins, une diminution de la taille de la rate ainsi qu'une diminution de la fréquence des progéniteurs JAK2^{V617F} dans la moelle et la rate. L'accumulation de ROS dans les cellules est associée à une augmentation des dommages à l'ADN incluant notamment la présence de cassures double brins visualisées par la présence de foci g-H2AX.

D'autres études ont montré que JAK2^{V617F} entraîne aussi un stress réplicatif dans les cellules primaires provenant des patients PV et TE et dérégule la voie ATR/CHK1/P53 impliquée dans la reconnaissance des dommages à l'ADN. Dans les cellules de patients PV, il a été observé un défaut de progression de la fourche de réplication concomitant à un défaut de checkpoint intra S. De plus, il a été montré que l'inhibition de p53 dans les cellules provenant de patients atteints de PV conduit à une augmentation des dommages à l'ADN sans effet sur la survie de ces cellules (Chen et al. 2014). En parallèle, l'expression de JAK2^{V617F} dans les lignées murines Ba/F3 exprimant EPOR ainsi que dans les CD34⁺ de patients atteints de NMP entraîne une augmentation des niveaux d'expression de MDM2 et impacte la réponse aux dommages à l'ADN en inhibant P53. MDM2 est une protéine qui conduit à la dégradation de P53. L'utilisation de la Nutlin-3a, un antagoniste de MDM2 (*murine double minute 2*), permet de rétablir la fonction de P53 et son rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN et permet également de rétablir la sensibilité des cellules aux cytokines (Nakatake et al. 2012).

De plus, notre équipe a également montré une dérégulation des mécanismes de réparation de l'ADN en particulier une augmentation de la recombinaison homologue (RH) et de la mutagenèse par JAK2^{V617F} (Plo et al. 2008). Cette RH est associée à une augmentation des échanges des chromatides sœurs dans les lignées cellulaires mais également dans les cellules CD34⁺ dérivées de patients NMP. Une autre étude met en évidence que les cellules JAK2^{V617F} ont une augmentation des recombinaisons interchromosomiques associées à l'augmentation de la production de ROS. L'augmentation de la RH est associée à une élévation de la fréquence de perte d'hétérozygotie neutre en copie (*copy-neutral loss of heterozygosity* : CN-LOH) (Gaymes et al. 2017). De manière intéressante, l'augmentation de la RH pourrait être impliquée dans l'acquisition de l'homozygotie de JAK2^{V617F} qui a lieu par recombinaison mitotique (L. Wang et al. 2014).

Ainsi JAK2^{V617F}, en dérégulant les ROS, la RH, la voie P53 et en induisant un stress réplicatif, entraîne une augmentation des dommages à l'ADN et contribue à l'instabilité génomique ce qui semble particulièrement vrai dans la lignée érythroïde qui présente un niveau de prolifération élevé (figure 11).

Des mécanismes de régulation de ces processus ont aussi été observés. Par exemple, dans les colonies BFU-E de cellules exprimant JAK2^{V617F}, l'expression du gène RECQL5 augmente. Cette hélicase de l'ADN joue un rôle important dans la stabilité du génome et régule la RH (Chen, Ahn, et al. 2015, 5). Ainsi, l'augmentation de RECQL5 permet de diminuer le stress réplicatif et l'instabilité génomique induit par JAK2^{V617F} (figure 11).

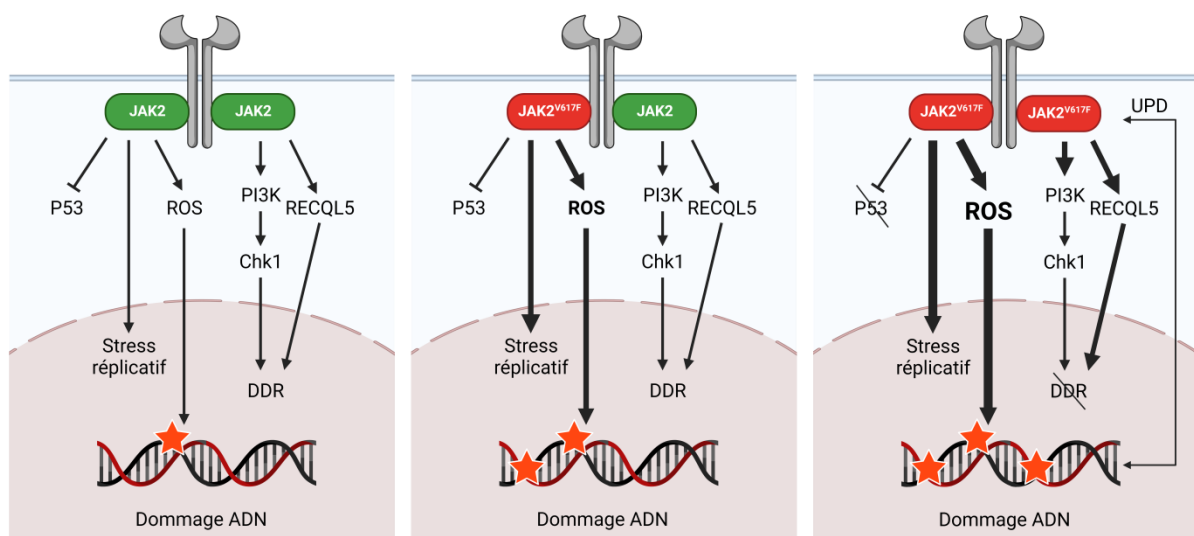


Figure 11 : Rôle de JAK2^{V617F} sur les dommages à l'ADN et système de réparation

La signalisation normale de JAK2 (à gauche) induit un stress réplicatif et la production de ROS conduisant à des dommages à l'ADN. En parallèle, elle régule l'activation de la signalisation médiée par Chk1 et les systèmes de réparation à l'ADN (DDR : *DNA damage repair*) médié par RECQL5 contribuant au maintien de l'intégrité du génome. Lorsque la mutation JAK2^{V617F} apparaît (au centre), l'activation constitutive de JAK2 engendre une augmentation des dommages à l'ADN et également des systèmes de réparation de l'ADN conduisant à une augmentation des recombinaisons homologues et l'acquisition d'une disomie uniparentale (UPD) (droite). L'augmentation de la charge allélique de JAK2^{V617F} augmente les niveaux de ROS et les dommages à l'ADN mais diminue également l'activation de P53 en réponse au dommage de l'ADN. En parallèle une augmentation de RECQL5 contribue à augmenter la stabilité du génome et contrecarre les dérégulations engendrées par JAK2^{V617F}.

Enfin, il a aussi été montré que JAK2^{V617F} peut avoir une fonction nucléaire en phosphorylant l'histone H3Y41. De cette façon la protéine d'hétérochromatine HP1a n'est plus fixée sur le promoteur du gène *lmo2* contribuant ainsi à l'expression de l'oncogène *LMO2* et induit son expression (Dawson et al. 2009). Ces données suggèrent que JAK2^{V617F} induit un effet transformant *via* la dérégulation d'oncogènes.

v. JAK2^{V617F} : une mutation motrice

La preuve définitive que JAK2^{V617F} est bien responsable de la maladie et le fait que plusieurs groupes dont notre laboratoire ont montré que JAK2^{V617F} induit bien ces maladies et leur progression vers la myélofibrose dans des modèles rétroviraux, transgéniques ou knock-in chez la souris. Ces expériences ont aussi montré que le niveau d'expression de JAK2^{V617F} comparé à JAK2^{WT} avait un impact sur le phénotype. Ainsi, lorsque JAK2^{WT} est prédominant, la souris développe une thrombocytose typique de la TE (Tiedt et al. 2008). A l'inverse, lorsque JAK2^{V617F} est majoritaire, la souris présente un phénotype proche de la PV notamment *via* une augmentation de l'érythropoïèse qui progresse vers la myélofibrose caractérisée par une anémie, une hyperleucocytose, une augmentation des fibres de réticuline dans la moelle et une splénomégalie (Salma Hasan et al. 2013; Lacout et al. 2006). Ces expériences corrélerent avec les données chez les patients qui montrent que l'expression de JAK2^{V617F} est plus importante chez les patients atteints de PV et MFP par rapport aux patients atteints de TE. Ces observations corrélerent avec la présence plus fréquente des clones homozygotes dans les cas de PV et MFP avec une charge allélique globale également plus importante (Tiedt et al. 2008) (voir plus bas).

vi. Mutation JAK2 exon 12

Deux ans après la découverte de la mutation JAK2^{V617F}, des études ont montré qu'il existait des mutations au niveau de l'exon 12 de JAK2 chez certains patients. Ces mutations sont retrouvées uniquement chez 2% des patients atteints de PV et ne sont pas retrouvées dans les cas de TE et MFP. Les patients qui portent ces mutations ont un phénotype proche de celui induit par la mutation JAK2^{V617F} dans les PV. Cependant, l'âge moyen du diagnostic est plus bas que dans le cas de JAK2^{V617F} (52 ans en moyenne). Par ailleurs, le taux d'hémoglobine est plus important et le nombre de plaquettes est inférieur comparés aux patients JAK2^{V617F} (Scott et al. 2006).

Ces mutations de l'exon 12 se trouvent au niveau de la jonction entre les domaines de type SH2 et pseudokinase de JAK2 (voir iii. Figure 10). Contrairement à JAK2^{V617F}, les mutations de l'exon 12 sont retrouvées exclusivement à l'état hétérozygote et ne donnent qu'un phénotype érythrocytaire (érythrocytose pure). Ces mutations sont présentes en faible proportion dans les granulocytes ce qui peut rendre leur détection difficile. La charge allélique est généralement plus élevée dans la moelle que dans le sang.

En termes de signalisation, les mutations de l'exon 12 ont des effets similaires à celles de JAK2^{V617F}. Des expériences de surexpression de JAK2^{exon12} dans des lignées murines démontrent que ces mutants induisent une augmentation de la phosphorylation de JAK2, STAT5 et également ERK (Scott et al. 2007). Globalement, ces mutations ont un effet similaire à JAK2^{V617F} chez les patients TE avec une augmentation de l'activation de JAK2, STAT5, ERK, STAT1 (A. L. Godfrey et al. 2016, 12).

b. MPL

i. Structure et fonctions

MPL est une protéine qui fait partie de la famille des récepteurs homodimériques de classe I. Le gène *MPL* est localisé sur le chromosome 1 (1p24) et code pour une protéine de 70 kDa qui se dimérise pour former le récepteur sous forme d'homodimère. Cette protéine est composée de trois domaines : un domaine intracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine extracellulaire. Au niveau du domaine extracellulaire, la protéine porte deux domaines de liaison aux cytokines conservés et caractérisés par quatre résidus cystéines et un motif WSXWS. Sous la membrane plasmique se trouve le domaine juxtamembranaire ou amphipathique RWQFP qui prévient de la dimérisation du récepteur en l'absence de cytokine. Le domaine intracellulaire du récepteur permet la fixation de JAK2 qui est nécessaire à la médiation du signal de MPL. Sur ce même domaine, la Janus Kinase Tyk2 peut également se fixer mais n'est pas indispensable à la médiation du signal.

MPL est associée à JAK2 et Tyk2 au niveau du RE. Ces tyrosines kinases jouent le rôle de chaperonne pour le récepteur et permettent un « pré-assemblage » du récepteur sous forme d'homodimères et augmentent également le trafic du récepteur à la membrane. Dans le RE, MPL porte des oligosaccharides sur ses quatre résidus asparagines (N-glycosylé) de son domaine extracellulaire. Le récepteur trafique vers l'appareil de golgi associé à JAK2 et Tyk2 où il mature grâce à des actions de glycosylation. Il est ensuite adressé à la surface sous forme pré-dimérisé et inactif.

La TPO se fixe sur les résidus D261 et L265 extramembranaires de MPL ce qui permet d'augmenter sa stabilité et un changement de conformation qui conduit à un rapprochement des domaines intracellulaires du récepteur. De ce fait, les tyrosines kinases se rapprochent, se transphosphorylent et phosphorylent le récepteur sur ses résidus tyrosines. Ces dernières permettent la fixation de protéines cibles telles que les STAT1,

STAT3 et STAT5 ainsi que des protéines de plateforme qui vont permettre d'activer la voie PI3K/AKT et la voie des MAP kinases (Plo et al. 2017).

ii. Mutation MPL dans les NMP

La découverte de la mutation JAK2^{V617F} a permis de montrer l'importance de l'activation constitutive de la voie JAK2/STAT chez les personnes atteintes de NMP et qui portent cette mutation. Ces découvertes ont amené l'hypothèse que d'autres mutations conduisant à l'activation constitutive de cette voie pourraient être impliquées comme celles sur MPL, G-CSFR ou EPOR. En 2006, une équipe a ainsi mis en évidence des mutations du gène codant pour le récepteur MPL au niveau du résidu W515 présent chez 9% des patients (Pardanani et al. 2006; Pikman et al. 2006). Par la suite, d'autres études ont été menées et ont montré d'autres mutations du résidu W515 (W515K/L/G/S/R) (Beer et al. 2008; Defour et al. 2016; Plo et al. 2017). Plus rarement, d'autres mutations sont impliquées dans des cas de NMP (figure 12)(Plo et al. 2017).

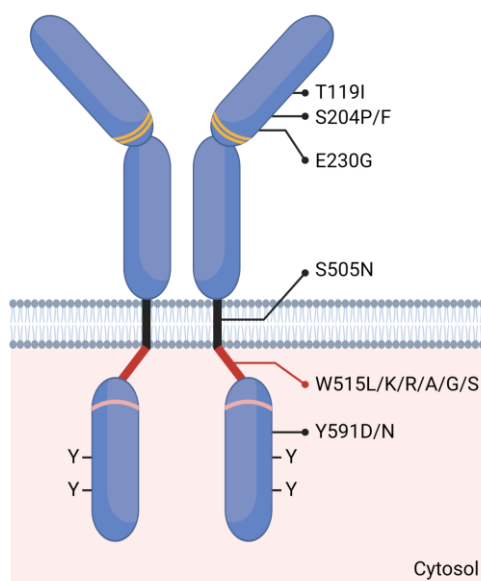


Figure 12 : Récepteur MPL et ses mutations dans les NMP

Le récepteur MPL est composé d'un domaine extracellulaire qui permet la liaison de la TPO (site de liaison en jaune), d'un domaine intracellulaire, un domaine juxtamembranaire (en rouge) et d'un domaine intracellulaire qui permet la liaison des protéines JAK2 et TYK2 (site de liaison en rose) et le recrutement de protéines sur les résidus tyrosines (Y). Les mutations impliquées dans les NMP touchent différents codons, les plus fréquentes concernent le codon W515 au niveau du domaine juxtamembranaire.

Toutes ces mutations sont des mutations « gain de fonction » et conduisent à une activation constitutive du récepteur MPL. Des études ont permis de montrer que les mutations sur le résidu W515 permettent une prolifération indépendante des cytokines *in vitro* ainsi qu'une augmentation de la sensibilité à la TPO. De plus, des expériences de greffes de cellules de moelle osseuse exprimant une mutation de MPL au niveau du résidu W515L ont été réalisées chez la souris. Dans ce contexte, ces mutations récapitulent le développement d'une TE qui progresse très rapidement en myélofibrose avec l'accumulation de fibres de réticuline dans la moelle et la rate ainsi qu'une splénomégalie due à une hématoïèse extra médullaire (Pikman et al. 2006).

c. La calréticuline (CALR)

i. Fonctions de la calréticuline

Le réticulum endoplasmique (RE) est un lieu de synthèse des protéines membranaires (ou sécrétées) qui participe à leur bon repliement ainsi qu'à leur maturation. C'est également un lieu de stockage du calcium (Ca^{2+}) qui joue un rôle important dans le métabolisme de la cellule. Pour contrôler et assurer un bon repliement des protéines dans le RE, il existe différentes familles de protéines telles que les lectines et les protéines de la famille HSP (heat shock protein). La CALR, comme son homologue la calnexine, est une chaperonne majeure résidente du RE, région où les protéines néosynthétisées subissent des modifications post-traductionnelles. Parmi ces modifications, les résidus asparagines (Asn ou N) portés par ces protéines peuvent être modifiés et porter un oligosaccharide Glc3Man9GlcNAc2 . Ces protéines vont perdre deux résidus de glucose (Glc) *via* l'action des α -Glucosidase I et II. La calréticuline reconnaît et s'associe aux protéines portant un glucose terminal Glc1Man9GlcNAc2 , adoptant une conformation repliée grâce à l'action d'ERp57, continuant ainsi sa maturation à l'aide de la glucosidase I et la mannosidase I. Si la protéine N-glycosylée est correctement repliée et maturée, elle est exportée vers l'appareil de golgi où elle continue sa maturation et son acheminement à la surface de la cellule (D. B. Williams 2006) (figure 13).

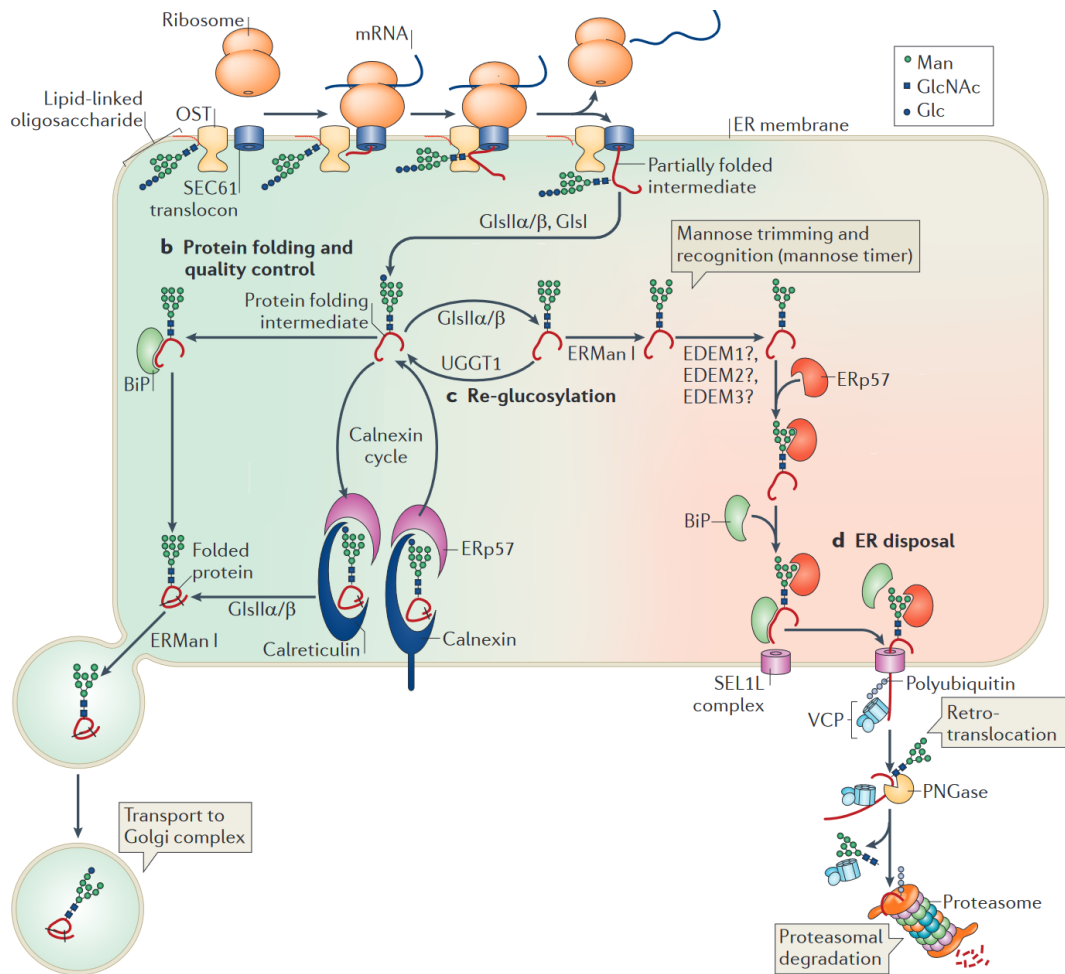


Figure 13 : Maturation et contrôle qualité des protéines N-glycosylé dans le RE (Moremen, Tiemeyer, et Nairn 2012)

Les protéines néosynthétisées dans le RE peuvent subir des modifications post-traductionnelles comme l'ajout d'oligosaccharide (Glc3Man9GlcNAc2) sur leurs résidus asparagines (a). Une fois ces protéines glycosylées, grâce à l'action des glucosidase I et II (GlsI et $\text{GlsII}\alpha/\beta$), deux résidus glucoses sont retirés, la protéine en cours de maturation est reconnue par la calréticuline ou la calnexine liée à ERp57 qui va pouvoir alors participer au repliement de la protéine *via* la formation de pont disulfure. La protéine subit de nouveau une glycosylation et l'action de la mannosidase I (ERManI) qui élimine un résidu mannose du résidu N-glycosylé. La protéine correctement maturée migre vers l'appareil de golgi où elle continuera sa maturation et son trafic *via* la voie endosomale jusqu'à la membrane.

La calréticuline participe également à l'homéostasie calcique. Elle permet de lier le calcium (qui joue un rôle important dans divers processus cellulaires) et est responsable de plus de 50% du stockage de calcium dans le RE (région de stockage principale du calcium). Des variations de concentration calcique dans le RE peuvent influencer certains processus notamment l'activité chaperonne des protéines qui peut altérer le trafic entre le RE et l'appareil de golgi ainsi que le transport de protéines grâce aux pores nucléaires. En plus de son rôle chaperonne et de liaison au calcium, la CALR est impliquée dans l'immunité, l'angiogenèse ou l'apoptose surtout quand elle est exposée à la surface ou sécrétée (Michalak et al. 2009).

ii. Structure de la CALR

La calréticuline est une protéine de 46 kDa qui réside dans le RE grâce à un signal de rétention KDEL au niveau de la partie C-terminale (C-ter) de la séquence protéique. Cette protéine est composée de trois domaines fonctionnels : un domaine globulaire N, un domaine P et un domaine C. Au niveau N-terminal de la séquence protéique de la calréticuline, on retrouve le domaine N et P. Ces deux domaines portent des résidus capables de reconnaître et de lier les protéines N-glycosylées. Au niveau du domaine C-terminal de la protéine, on retrouve de nombreux résidus chargés négativement qui permettent la liaison du calcium et sa rétention dans le RE KDEL (figure 14)(Michalak et al. 2009).

iii. Les mutations de la calréticuline

Les mutations de *JAK2* et *MPL* découvertes en 2005 et 2009 sont impliquées dans 50 à 60% des NMP. Après ces découvertes, des études ont été réalisées sur les patients ne présentant pas ces mutations par séquençage d'exomes à partir de granulocytes (PNN). Ces études ont permis en 2013 la découverte de mutations de *CALR* présentes dans environ 80% des NMP classiques non mutés pour *JAK2* ou *MPL* (Klampfl et al. 2013; Nangalia et al. 2013). Ces mutations de la calréticuline ont été retrouvées chez les patients atteints de TE et de MFP mais n'ont pas été répertoriées dans le cas des PV sauf dans le cas de maladies biconales. Elles se trouvent toutes au niveau de l'exon 9 du gène *CALR* et conduisent à un décalage du cadre de lecture d'une paire de base (+1 pb).

Deux variants sont fréquemment retrouvés chez les patients. Le premier est p.L367fs*46b et correspond à une délétion de 52 pb connu sous le nom de $CALR^{del52}$ (ou type I). Le second est p.K385fs*47 qui correspond à une insertion de 5 pb nommé $CALR^{ins5}$ (ou type II). Les autres mutations de *CALR* retrouvées chez ces patients sont plus rares, elles se comportent de la même façon que les deux mutations majeures et sont classées type I « like » ou type II « like ». Ces mutations de la *CALR* donnent une nouvelle queue C-terminale de la protéine quasi identique pour tous les mutants. Les résidus qui la composent sont en partie chargés positivement ce qui modifie les liaisons Ca^{2+} de la protéine. Les protéines mutantes perdent également le motif de rétention dans le RE KDEL (figure 14).

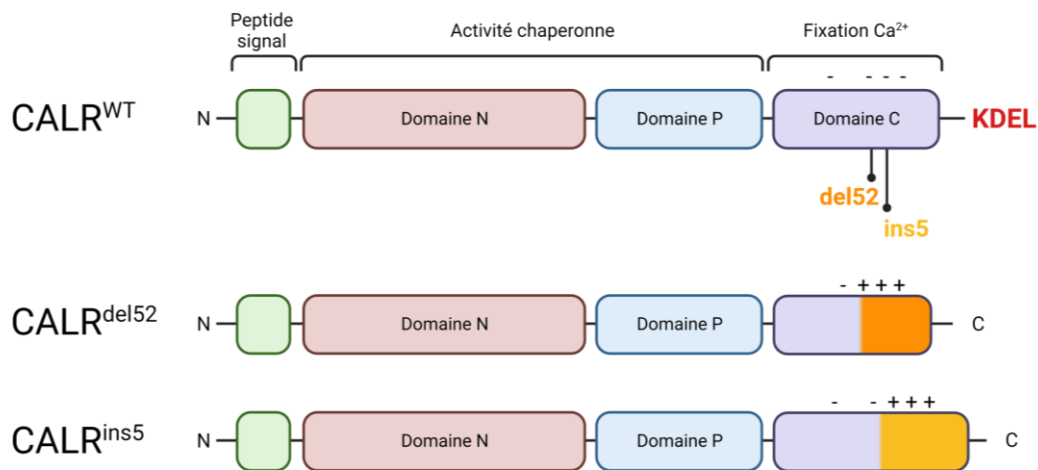


Figure 14 : Structure de la protéine CALR Wild-type et mutée

Structure de la protéine CALR sauvage (CALR^{WT}) composée de deux domaines à activité chaperonne (domaines N et P) et d'un domaine C qui fixe le calcium. Au niveau de la queue C-terminale, on retrouve le motif KDEL de rétention dans le RE. Les mutations de la CALR se retrouvent dans le domaine C et conduisent à deux types de mutations majoritaires : CALR^{del52} ou CALR type I avec une queue C-ter plus courte et chargée positivement, ainsi que CALR^{ins5} ou CALR type II avec une queue C-ter plus longue et chargée positivement également. Ces deux protéines mutantes ont perdu le motif de rétention dans le RE KDEL.

Plusieurs papiers ont montré que la CALR mutante (CALR^m) est capable de se fixer à MPL et d'induire l'activation de façon constitutive des voies JAK2/STAT, MAPK et PI3K/AKT. De plus, ces mutants conduisent à la prolifération spontanée des lignées cellulaires Ba/F3 ou UT-7 de façon dépendante de l'expression du récepteur MPL et de la protéine JAK2. En revanche, la CALR^m n'a pas la même activité en présence des récepteurs EPOR et une activité minimale avec G-CSFR (Chachoua et al. 2016; Elf et al. 2016; Caroline Marty et al. 2016; Nivarthi et al. 2016). Ces expériences permettent notamment d'expliquer l'implication de la CALR^m dans les TE et MFP, qui touche principalement la mégacaryopoïèse régulée par la TPO et son récepteur MPL, mais explique également son absence dans les PV, gouvernée par l'EPO et son récepteur EPOR dans l'érythroïèse.

L'activation du récepteur MPL et des voies JAK/STAT induites par la CALR^m nécessitent l'interaction directe entre MPL et CALR^m sur la partie extracellulaire du récepteur. Cette interaction dépend des N-glycosylation de MPL et du domaine lectine de la CALR^m. Plus précisément, au cours de la maturation de MPL dans le RE, la CALR^m se fixe sur le résidu asparagine N117 de MPL qui porte l'oligosaccharide Glc1Man9GlcNAc2 et empêche sa maturation (figure 15). Des expériences d'immunofluorescences utilisant la technologie NanoBRET ont permis de montrer que la CALR^m reste associée à MPL au cours de son

acheminement à la surface *via* la voie sécrétoire. De ce fait, le récepteur MPL se retrouve à la surface de la cellule partiellement immature (pas complètement glycosylé)(Chachoua et al. 2016; Liu et al. 2020; Pecquet et al. 2019). De plus, dans ces papiers, il a été montré que la CALR^m est capable d'induire l'activation de MPL de manière indépendante des cytokines au cours de son trafic après le RE et à la surface de la cellule où l'activation du récepteur est la plus importante.

De manière intéressante, les mutants de CALR sont aussi capables d'engendrer l'adressage à la surface et l'activation de récepteurs MPL défectueux dus à leur blocage dans le RE et généralement trouvés dans les amégacaryocytoses congénitales (MPLR102P par exemple) ou restaurer leur activation par l'eltrombopag (MPLR464G) (Basso-Valentina et al. 2021; Pecquet et al. 2019).

CALR^m a été aussi montrée comme étant sécrétée (Han et al. 2016; Pecquet et al. 2019) et capable de s'oligomériser sur MPL afin de le stabiliser (Araki et al. 2019). Dans un travail en cours de révision à Blood et dans lequel je signe en co-premier auteur (annexe n°4), nous avons également déterminé que la CALR mutée est sécrétée dans le sang et est proportionnelle à la charge allélique mesurée dans le sang. De plus, l'ajout de CALR^{del52} recombinante (rhCALR^{del52}) est capable d'augmenter l'activation de la voie JAK2/STAT5 dans des lignées cellulaires.

Par ailleurs, dans des expériences de culture à l'échelon unicellulaire à partir de progéniteurs mégacaryocytaires triés (CD34⁺, CD41⁺) de patients CALR^m ou JAK2^{V617F} en comparaison à des donneurs sains, nous montrons que la rhCALR^{del52} est capable de mimer l'effet de la TPO en augmentant la pousse spontanée des progéniteurs mégacaryocytaires CALR^m. En revanche, la rhCALR^{del52} n'est pas capable d'augmenter cette pousse spontanée des cellules issues de patients NMP JAK2^{V617F} ou de donneurs sains. Ceci démontre que la CALR^m sécrétée peut amplifier la signalisation MPL/JAK2/STAT uniquement dans les cellules mutées pour la CALR. Cet effet pourrait s'expliquer d'une part car la CALR^m est capable de s'oligomériser sur MPL et d'autre part, parce que les cellules CALR^m acheminent un récepteur MPL immature à la surface avec une affinité particulière pour la CALR^m.

En plus de son effet de cytokine anormale, la CALR^m sécrétée est capable de jouer sur l'immunité en bloquant la fonction de la CALR normale et la phagocytose des cellules dendritiques (Liu et al. 2020).

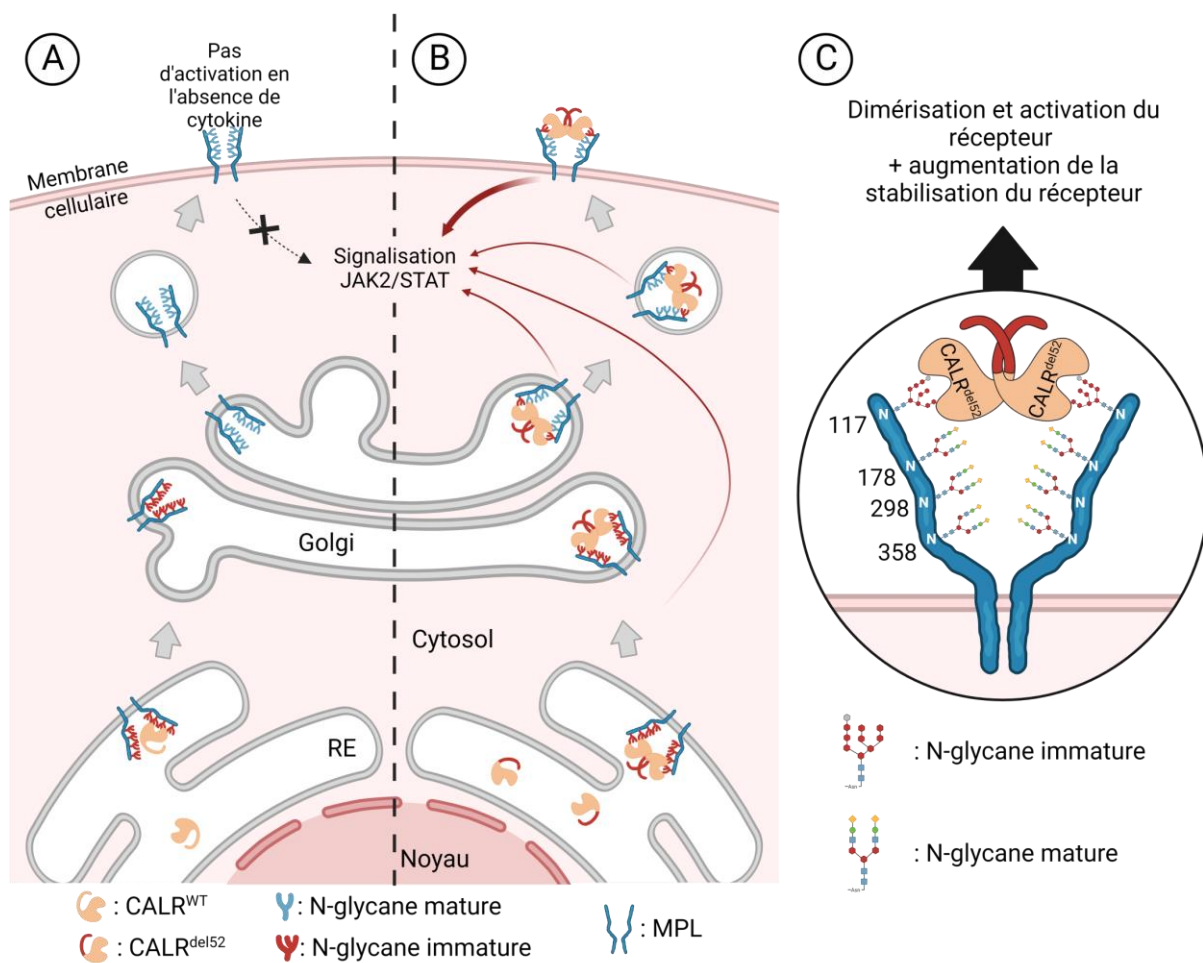


Figure 15 : Mécanisme d'action de CALR^{del52} (adapté de Pecquet et al. 2019)

(A) Schéma de la maturation classique de MPL dans le RE et l'acheminement à la membrane. MPL est chaperonnée par la CALR dans le RE permettant son repliement correct et son acheminement vers l'appareil de Golgi. Il y subira des modifications des résidus N-glycane permettant ainsi sa maturation avant d'être exporté à la membrane où il sera inactif jusqu'à ce qu'il soit en présence de son ligand. (B) Mécanisme d'action de la CALR mutante (ici CALR^{del52}) qui se lie au récepteur MPL dans le RE et migre à la membrane de la cellule en passant par l'appareil de Golgi. La fixation de la CALR^{del52} sur le récepteur MPL permet son activation dans les différentes organelles et majoritairement à la surface. (C) La CALR^{del52} se multimérise et se fixe sur le récepteur MPL au niveau du résidu N117 portant un oligosaccharide (glycane) immature. Sa fixation empêche la maturation totale du récepteur. Cette fixation permet l'activation du récepteur et augmente également sa stabilité sous forme de dimère.

d. Rôle de JAK2^{V617F}, CALR^m et MPL^{W515K,L} sur l'hématopoïèse

Depuis les années 1970 plane l'idée que les NMP sont des pathologies qui ont pour origine les CSH conduisant à une hématopoïèse clonale. Dans le sang, la charge allélique de la mutation JAK2^{V617F} est généralement faible dans les TE (10 à 30%), puis augmente dans les PV (30 à 60%) et dans les MFP (>50%). De plus, la détection de la mutation JAK2^{V617F} dans plusieurs types de cellules hématopoïétiques sanguines a montré sa présence non seulement dans les cellules matures myéloïdes (plaquettes, granuleux et monocytes) mais également dans les cellules lymphoïdes Lymphocytes B (LB), « Natural Killer » (NK) y compris les lymphocytes T (LT) (cellules à durée de vie extrêmement longue) dans les MFP, plus rarement dans les PV et exceptionnellement dans les TE. La détection de cette mutation dans ces différents types cellulaires et dans des colonies dérivées d'essais clonogéniques à long-terme (LTC-IC) suggère fortement la présence de la mutation au niveau des progéniteurs communs aux lignées lymphoïdes et myéloïdes (Delhommeau et al. 2007). Par la suite, grâce à des expériences de xénogreffes dans des souris immunodéficientes (NOD/SCID), il a été montré que le compartiment des CSH des patients atteints de PV ou MFP contient des cellules JAK2^{V617F} multipotentes capables de s'autorenouveler et de repeupler la moelle osseuse sur le long-terme (Chloe James et al. 2008). De façon intéressante, ces expériences montrent une certaine hétérogénéité entre les cellules provenant de patients atteints de PV et MFP (la proportion de CSH mutées est plus importante dans les MFP par rapport aux PV). De plus, des études d'architectures clonales sur les progéniteurs et des cellules souches à la suite d'essais clonogéniques en méthylcellulose, ont montré que JAK2^{V617F} est peu présente au niveau des progéniteurs les plus immatures (CD34⁺CD38⁻) dans les TE et est retrouvée surtout à l'état hétérozygote muté. Lorsqu'un clone homozygote apparaît, il prend l'avantage sur le clone hétérozygote augmentant ainsi la charge allélique de façon importante chez les patients atteints de PV (Anna L. Godfrey et al. 2012). Au stade MFP, la majorité des progéniteurs sont envahis par la mutation le plus souvent à l'état homozygote.

En ce qui concerne l'avantage de JAK2^{V617F} dans l'hématopoïèse, la fraction clonale dans les progéniteurs ou la charge allélique de la mutation reste généralement peu élevée dans les progéniteurs immatures mais augmente surtout dans les stades plus tardifs de la

différenciation érythroïde et myéloïde (Dupont et al. 2007). Une autre étude importante a confirmé ces données en montrant qu'il n'y a pas d'expansion des progéniteurs immatures ($CD34^+CD38^-$) dans les TE et les PV mais qu'au contraire il y a une augmentation des cellules différenciées en particulier dans les lignées érythrocytaires ($CD34^-CD71^+GPA^+$) et mégacaryocytaires ($CD34^-CD41^+$) dans les PV et la lignée mégacaryocytaire dans les TE (Anand et al. 2011; Dupont et al. 2007). Ainsi, $JAK2^{V617F}$ ne donne qu'un avantage limité au niveau du compartiment des cellules souches et des progéniteurs mais un avantage prolifératif élevé dans les stades plus avancés de la différenciation myéloïde. Cet avantage s'explique notamment par l'augmentation de la signalisation cellulaire impliquant JAK2 surtout au cours de la différenciation quand l'expression des récepteurs augmente (EPOR, G-CSFR, MPL).

En ce qui concerne les mutations additionnelles à $JAK2^{V617F}$, elles peuvent apparaître avant ou après $JAK2^{V617F}$ ou même de façon indépendante de $JAK2^{V617F}$ (TET2, DNMT3A). Les mutations TET2 entraînent généralement une dominance clonale plus élevée de la mutation au niveau des CSH (Delhommeau et al. 2009).

Dans une étude sur le rôle de $CALR^m$ dans l'hématopoïèse humaine que nous avons conduite au laboratoire et dans laquelle je suis cosignataire (annexe n°1), nous avons retrouvé des mutations de $CALR$ de type 1 et de type 2 au niveau des plaquettes, des granulocytes, des monocytes mais également au niveau des LB, NK et LT y compris dans les TE. Ces résultats suggèrent une dominance clonale plus importante de $CALR^m$ par rapport à $JAK2^{V617F}$. De plus, toujours contrairement à la mutation $JAK2^{V617F}$, les mutations $CALR^m$ sont présentes dans une fraction élevée des progéniteurs (>50%) y compris ceux enrichis en CSH ($CD90^+,CD34^+,D38^-$) dans les cas des TE et MFP (El-Khoury et al. 2020). Même si la majorité des progéniteurs présentaient des mutations à l'état hétérozygote, une fraction non négligeable de patients de type 2 présentaient aussi une petite fraction de progéniteurs homozygotes (El-Khoury et al. 2020; Klampfl et al. 2013) suggérant que les $CALR^m$ de type 2 doivent atteindre une dominance clonale plus élevée au niveau des progéniteurs pour induire la maladie. Des études de xéno greffes dans les souris immunodéficientes (Celik et al. 2021) ont également permis de montrer que ces mutations surviennent au niveau des CSH. Enfin, l'analyse de la fréquence allélique entre les stades de progéniteurs et les cellules matures (granuleux) montre que $CALR^m$ envahit presque tout le compartiment des

progéniteurs/CSH et ne donne pas d'avantage évident au cours de la différenciation hématopoïétique. Ceci contredit une étude de Nam et al. montrant par une étude de scRNA-seq couplée au génotypage que les progéniteurs hématopoïétiques malins ont un avantage prolifératif croissant avec la différenciation myéloïde (Nam et al. 2019).

En ce qui concerne les mutations additionnelles, elles apparaissent dans la plupart des cas après les mutations CALR^m surtout au cours de la progression en MF suggérant que ces mutations sont suffisantes pour induire la maladie en amplifiant à elles seules les CSH.

Au total, les maladies JAK2^{V617F} et CALR^m sont définies comme deux types assez différents de NMP sur le plan hématopoïétique.

Dans le cas des patients MPL^{W515K,L}, on retrouve la mutation dans les granulocytes, les monocytes, les plaquettes et les NK mais pas dans les lymphocytes T (Chaligné et al. 2007). De plus, la mutation est toujours détectée après 12 semaines de xénogreffe dans des souris NOD/SCID démontrant leurs capacités de reconstitution à long-terme et donc la présence de cette mutation au niveau du compartiment des CSH.

De nombreuses études ont démontré l'implication des mutations motrices au niveau des CSH mais des questions subsistent, en particulier : comment et quand surviennent ces mutations, comment elles s'amplifient au niveau des CSH pour donner une dominance clonale suffisante pour déclencher une maladie. Ces questions sont cruciales pour comprendre l'initiation de ces maladies et par conséquent détecter des patients à risque de déclencher la maladie. De façon intéressante, plusieurs études récentes ont montré à l'aide d'expériences de séquençage du génome complet (WGS) des colonies de progéniteurs que l'acquisition de ces mutations au niveau des CSH se faisait des dizaines d'années avant le diagnostic de la maladie. Ceci a pu être déduit de la construction d'arbres phylogénétiques des mutations combinés à une échelle de temps de l'apparition des mutations. Dans le cas de JAK2^{V617F}, l'acquisition de cette mutation peut avoir lieu dans l'enfance voir même durant la vie fœtale (Van Egeren et al. 2021; N. Williams et al. 2022). De plus, leur expansion semble être variable au cours du temps et est souvent augmentée par des événements génétiques associés. Au laboratoire, nous avons aussi étudié cette question par une approche différente qui combine un modèle mathématique et des résultats expérimentaux de fractions clonales

dans les progéniteurs de 11 patients $JAK2^{V617F}$ ou 15 patients $CALR^m$ en connaissant l'âge des patients au moment où les échantillons ont été collectés. Grâce à un modèle stochastique décrit comme une chaîne de Markov à temps continu, nous avons pu déduire le nombre de CSH mutées entre le moment de l'acquisition de la mutation et le moment de l'échantillonnage. Ainsi nous avons obtenu des résultats très similaires aux études précédentes pour $JAK2^{V617F}$ avec un âge moyen d'acquisition de la mutation à 15 ans. Dans le cas de $CALR^m$, la mutation apparaît plus tardivement que $JAK2^{V617F}$, en moyenne à l'âge de 25 ans (figure 16).

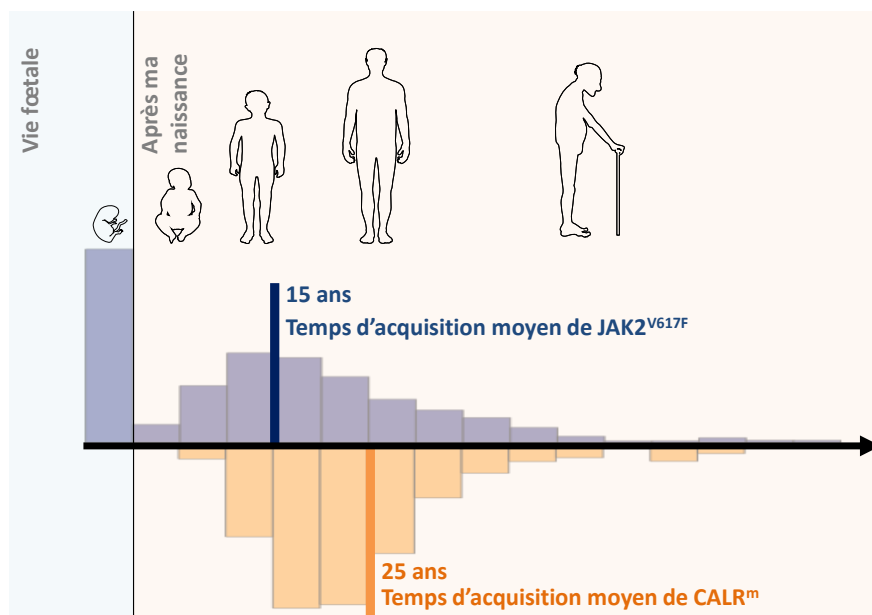


Figure 16 : Schéma de l'acquisition de la mutation $JAK2^{V617F}$ et $CALR^m$ (Hermange et al. 2022)

Schéma montrant les probabilités d'acquiescence de la mutation $JAK2^{V617F}$ (en bleu) ou $CALR^m$ (en orange) au cours du temps selon un modèle mathématique. La mutation $JAK2^{V617F}$ peut être acquiescée durant la vie fœtale contrairement aux mutations $CALR^m$. En moyenne la mutation $JAK2^{V617F}$ est acquiescée vers l'âge de 15 ans tandis que $CALR^m$ apparaîtrait vers l'âge de 25 ans.

Enfin, ce modèle a également permis de définir le paramètre Δ qui correspond globalement au taux d'auto-renouvellement des CSH mutées. Nous avons alors déterminé que Δ_{CALR^m} est supérieur au $\Delta_{JAK2^{V617F}}$ suggérant par une autre méthode que $JAK2^{V617F}$ a un effet prolifératif moindre que $CALR^m$ sur les CSH. Ce modèle a aussi permis d'inférer l'âge auquel la population générale doit être dépistée pour détecter les patients à risque de développer un NMP (aux alentours de 30 ans pour les patients JAK^{V617F} et 35 ans pour les patients $CALR^m$) (Hermange et al. 2022)(annexe n°3 dans lequel je suis cosignataire).

e. Mutations associées

La grande majorité des patients atteints de NMP portent l'une des trois mutations motrices $JAK2^{V617F}$, $CALR^m$ ou des mutations de MPL qui conduisent à une hématoïèse clonale. En revanche, ces mutations n'expliquent pas les différences phénotypiques et l'hétérogénéité entre les patients.

Il existe dans les NMP des mutations additionnelles aux mutations motrices qui sont retrouvées dans quasiment toutes les hémopathies malignes (SMD, leucémies...). Contrairement aux mutations motrices des NMP, ces mutations dites « associées » sont des mutations qui ne vont pas causer la myéloprolifération ou déclencher la maladie. En contrepartie, ces mutations peuvent contribuer à l'initiation, à la progression de la maladie et à la modification du phénotype des patients. On retrouve des mutations de gènes codant pour des protéines impliquées dans la méthylation de l'ADN (TET2, DNMT3A et IDH1/2), dans les modifications de la chromatine et des histones (ASXL1, EZH2) ou encore des facteurs d'épissage (SRSF2, SF3B1, U2AF1, ZRSR2). Il existe également des mutations de gènes codant pour des molécules de signalisation (SH2B3/LNK et CBL) et des facteurs de transcription (TP53 et RUNX1) (figure 17) (Easwar et Siddon 2021).

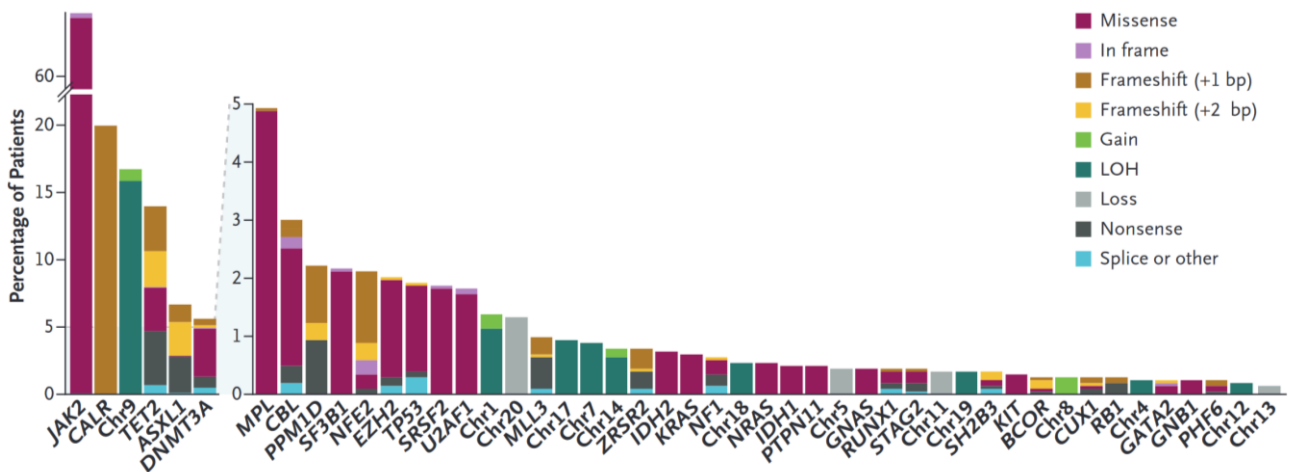


Figure 17 : Gènes fréquemment mutés et anomalies chromosomiques dans les NMP (Grinfeld et al. 2018)

Fréquence des gènes fréquemment mutés et anomalies chromosomiques retrouvées dans une cohorte de 2035 patients atteints de NMP.

Ces mutations associées sont plus fréquentes dans les cas de MFP qui est la pathologie la plus avancée. En effet, dans les cas de TE, seulement 30 % des patients présentent une ou plusieurs mutations autres que $JAK2^{V617F}$, $CALR^m$ ou MPL^m contre 50 à 60% des patients

atteints de PV et jusqu'à 80% des MFP (Grinfeld et al. 2018; Tefferi, Lasho, Guglielmelli, et al. 2016; Tefferi, Lasho, Finke, et al. 2016). Le nombre de mutations augmente également en fonction de l'âge des patients. Par ailleurs, les mutations TET2, ASXL1 et DNMT3A sont les plus fréquentes dans les NMP. De la même manière le gène *TP53*, connu pour être impliqué dans de nombreux cancers, est muté dans 2 % des NMP en phase chronique.

i. TET2

TET2 « ten eleven translocation » fait partie de la famille des protéines TET composée de TET1, TET2 et TET3. Ces enzymes catalysent l'oxydation de 5-méthylcytosine vers 5-hydroxyméthylcytosine qui peut conduire à la déméthylation de l'ADN et ainsi jouer un rôle dans l'expression génique. TET2 est un des gènes dont les mutations sont les plus retrouvées dans les NMP (12-14%) et de façon plus importante dans les MFP et les PV par rapport aux TE (10-20% dans les MFP/PV et 10% dans les TE) (Delhommeau et al. 2009; Grinfeld et al. 2018; Vainchenker et Kralovics 2017). La présence de mutation TET2 dans les NMP est associée à une diminution de la survie chez les patients (Lundberg et al. 2014). Dans les hémopathies, elles sont de différents types (faux sens, décalage du cadre de lecture, épissage, perte d'hétérozygotie) et conduisent à une perte de fonction de la protéine.

Delhommeau et *al.* ont montré à l'aide d'un modèle de souris (NOD-SCID), dans lequel ils ont greffé des CD34⁺ de patients, que les cellules JAK2^{V617F}/TET2-mutées étaient capables de repeupler la moelle de ces souris après 15 semaines avec un biais vers la lignée myéloïde. Par ailleurs, ils ont également réalisé des tests fonctionnels *in vitro* à partir de la moelle de ces souris et ont constaté que toutes les LTC-IC et progéniteurs étaient mutés pour TET2. Ces résultats démontrent que la mutation TET2 apparaît au niveau des CSH et que TET2 renforce la dominance clonale de JAK2^{V617F}. D'autres groupes ont montré que la perte de TET2 (TET2^{null}) accélère le phénotype NMP chez les souris JAK2^{V617F}. La perte de l'expression de TET2 donne un avantage compétitif aux cellules JAK2^{V617F}/TET2^{null} au niveau des CSH par rapport à JAK2^{V617F} qui conduit à l'expansion des précurseurs. De plus les analyses transcriptomiques démontrent que les cellules JAK2^{V617F}/TET2^{null} ont une augmentation de l'expression des gènes spécifiques de l'autorenouvellement dans les CSH (Chen, Schneider, et al. 2015). Le groupe de kameda et *al.* a montré à l'aide d'un modèle de souris que la perte de l'expression de TET2 (TET2 knock-down) combinée à l'expression de JAK2^{V617F} conduit à une aggravation du phénotype par rapport à l'expression de JAK2^{V617F} seule ainsi qu'une

augmentation des capacités d'autorenouvellement des CSH (Kameda et al. 2015). Lorsque des mutations de TET2 coexistent avec JAK2^{V617F} ou CALR^m, elles peuvent aussi bien apparaître avant ou après la mutation motrice. L'ordre d'apparition des mutations TET2 et JAK2 impacte les caractéristiques cliniques. En effet, les patients qui acquièrent JAK2^{V617F} en premier ont tendance à déclarer plutôt une PV tandis que ceux qui acquièrent une mutation TET2 en premier vont développer une TE. De façon intéressante, l'ordre des mutations donne un avantage différent au simple et au double mutant. Ainsi le compartiment des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques est dominé par les simples mutants TET2 chez les patients qui ont acquis TET2 en premier. À l'inverse, les CSH double mutantes JAK2^{V617F}/TET2 prennent l'avantage chez les patients qui ont acquis la mutation JAK2^{V617F} en premier (Ortmann et al. 2015).

ii. DNMT3A

Le gène *DNMT3A* code pour la protéine *DNA-methyltransferase 3A* qui, comme son nom l'indique, catalyse l'addition de groupe méthyl sur les régions riches en CpG de la chromatine active. La méthylation *de novo* de l'ADN par DNMT3A sur des régions spécifiques telles que les « enhancers » permet de les inactiver. Une perte de l'activité de DNMT3A entraîne une augmentation de l'expression de gènes et de l'accessibilité de la chromatine au niveau des « enhancers ». Le gène *DNMT3A* est muté dans environ 5% à 10% des NMP dans des proportions équivalentes dans les TE, PV et MFP. Les mutations de *DNMT3A* sont majoritairement des mutations faux-sens mais on retrouve également des mutations entraînant un changement du cadre de lecture ou qui altère l'épissage (Grinfeld et al. 2018).

Dans le cas de JAK2^{V617F}, il a été montré que la perte de DNMT3A induisait une transformation de la PV vers la MFP ainsi qu'une augmentation de l'autorenouvellement des CSH *in vitro* (Jacquelin et al. 2018). Tout comme TET2, il semblerait que l'ordre d'acquisition de la mutation par rapport à JAK2^{V617F} influence le phénotype des patients. En effet, dans le cas d'une acquisition d'une mutation de *DNMT3A* en premier, les patients développeront plutôt une TE. Dans le cas contraire, ce seront des patients atteints de PV (Nangalia et al. 2015). Il est à noter que les mutations de *TET2* comme de *DNMT3A* peuvent apparaître également dans des clones indépendants.

iii. TP53

La protéine P53 est un facteur de transcription impliquée dans la régulation de nombreux processus notamment le cycle cellulaire, l'apoptose et la régulation des dommages de l'ADN. Les mutations de *TP53* sont majoritairement des mutations faux-sens bien qu'il existe également des mutations qui entraînent un décalage du cadre de lecture (Grinfeld et al. 2018). Elles sont retrouvées chez les patients à l'état hétérozygote avec une charge allélique faible durant plusieurs années. Un clone homozygote ou hémizyote (LOH : loss of heterozygosity) peut également apparaître ce qui entraîne l'absence de l'allèle WT. Ceci entraîne une accélération de l'expansion du clone muté TP53 accompagné de l'apparition d'un caryotype complexe et conduit à une transformation en LAM (Rodriguez-Meira et al. 2022). Bien que TP53 soit muté dans seulement 3% des NMP, il est présent dans plus de 20% des LAM (Lundberg et al. 2014; Vainchenker et Kralovics 2017). Une perte de fonction de TP53 impacte sévèrement la survie des patients (Grinfeld et al. 2018).

Des modèles murins ont permis de montrer que le KO (*knock out*) de TP53 (TP53^{-/-}) ou qu'un mutant de TP53 associé à un allèle délété (TP53^{-/R172H}) est nécessaire pour induire la transformation leucémique (TL) dans des souris JAK2^{V617F/+}. De façon intéressante ces études ont montré que les LAM des souris JAK2^{V617F}/P53^{-/-} ou P53^{-/R172H} sont caractérisées par une expansion des progéniteurs MEP capables de donner la maladie dans une souris receveuse conduisant à une érythroleucémie pure (Li et al. 2022; Rampal et al. 2014; Tsuruta-Kishino et al. 2017). Li et al. montrent que la voie BMP2/SMAD est activée de façon aberrante au cours de la TL et conduit à un autorenouvellement anormal des MEP (Li et al. 2022).

iv. Mutations associées et dominance clonale au niveau des CSH

Ces dernières années, un certain nombre d'études ont décrit une hématopoïèse clonale dans la population générale de sujets asymptomatiques. Elle est principalement conduite par les mutations somatiques comme *DNMT3A*, *TET2*, ou *JAK2*^{V617F} et ont été nommées CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) ou ARCH (age related clonal hematopoiesis). En effet, elles sont rarement retrouvées dans la population jeune (avec une fréquence inférieure à 1% chez les moins de 40 ans). A l'inverse, ces mutations sont plus fréquentes dans les populations plus âgées (10 à 20 % des personnes de plus de 65 ans)(Genovese et al. 2014; Jaiswal et al. 2014). Bien que ces mutations soient retrouvées chez des sujets âgés sains, la présence de ces mutations est associée à une augmentation de la mortalité, des

risques cardiovasculaires et une augmentation des risques de déclarer une hémopathie maligne (Jaiswal et al. 2014). Chaque année, 0.5 – 1% des CHIP progresse vers une pathologie. De manière intéressante, des études récentes ont montré que les clones mutés DNMT3A et TP53 présentent les taux de croissance annuels moyens les plus lents, d'environ 5 % par an (N. Williams et al. 2022; Fabre et al. 2022). Les clones présentant des mutations de TET2 s'amplifient au niveau des CSH avec un taux d'environ 10 % par an. En revanche, quand ces mutations sont associées à JAK2^{V617F} dans les NMP, le taux de croissance de ces clones augmente beaucoup (Williams et al., 2022). Il est toutefois à noter qu'une croissance hétérogène a été inférée dans les clones JAK2^{V617F} seul des NMP qui diminue encore dans les sujets asymptomatiques de la population générale (Hermange et al. 2022; Watson et al. 2020). Toutefois cette hématopoïèse clonale est très importante à considérer et à étudier car elle permet de mieux comprendre l'initiation des NMP.

III. TRAITEMENTS

Aujourd'hui, il existe plusieurs traitements donnés aux patients NMP en première ou seconde ligne en fonction des pathologies et des facteurs de risques. Ainsi, les patients NMP sont globalement traités soit par des antiagrégants, de l'aspirine, de l'anagrélide ou de l'hydroxyurée dans les TE, soit par saignées, des traitements cytoréducteurs (hydroxyurée) et des inhibiteurs de JAK2 dans la PV et les MFP. Le but de ces traitements est d'atteindre une rémission hématologique, c'est-à-dire de normaliser les paramètres sanguins pour prévenir des risques d'évènements cardiovasculaires et de thromboses ou d'améliorer les symptômes comme la taille de la rate et la qualité de vie. Tous ces traitements sont donc symptomatiques et n'ont peu ou pas d'effet sur la maladie, son évolution et sa progression puisqu'ils ne sont pas capables de cibler les cellules mutées. De plus, pour certains d'entre eux, il existe des résistances ou des intolérances. Le seul traitement curatif est l'allogreffe de CSH qui n'est pratiquée que dans des stades avancés de MFP. De plus, ce traitement n'est possible que dans de rares cas du fait de l'âge des patients, des risques de comorbidité et de mortalité liés à l'allogreffe de moelle osseuse. Contrairement aux traitements uniquement symptomatiques, l'interféron alpha (IFN α) est un traitement intéressant, car il est capable à la fois d'induire une réponse hématologique chez les patients mais aussi d'induire une réponse moléculaire. Cependant il existe aussi des résistances ou des intolérances et les réponses moléculaires complètes sont peu nombreuses. Dans la recherche sur les NMP, il est donc important d'identifier de nouvelles thérapies ou d'améliorer les thérapies existantes pour guérir ces maladies ou modifier leur évolution. Dans cette démarche, il est donc important que les traitements ciblent les CSH mutées initiatrices de la maladie.

1. Traitements conventionnels selon la pathologie

a. Polyglobulie de Vaquez (PV)

Dans le cas de la PV, l'objectif principal est de diminuer l'hématocrite en dessous de 45% permettant ainsi de prévenir des risques de thromboses et d'accidents cardiovasculaires (Marchioli et al. 2013). Dans cette optique, le traitement qui est proposé en première ligne est la saignée. L'aspirine ou acide acétylsalicylique (AAS) est également recommandé en première ligne de traitement dans les PV dites de faible risque (âge < 60 ans et n'ayant jamais eu de thrombose). L'aspirine permet d'inhiber l'agrégation plaquettaire et prévient donc des risques de thromboses (Raffaele et al. 2004). Chez les patients de haut risque (âge > 60 ans et ayant déjà eu une thrombose), un traitement cytoréducteur par hydroxyurée (HU) est recommandé. En plus des évènements de thromboses, d'autres critères/symptômes tels que l'augmentation de la splénomégalie, un compte plaquettaire élevé ($> 1500 \times 10^9/L$) ou de leucocytes ($> 15 \times 10^9/L$) (Barbui et al. 2018) sont pris en compte pour passer à un traitement cytoréducteur. En seconde ligne, les patients qui ne répondent pas ou sont intolérants à l'HU peuvent être traités par l'IFN α ou par inhibiteur de JAK2 et de JAK1 (Ruxolitinib) (Vannucchi et al. 2015). Chez les patients très âgés il peut être également envisagé l'usage du busulfan, un agent alkylant de l'ADN (Barbui et al. 2018).

b. Thrombocytémie essentielle (TE)

En ce qui concerne la TE, l'âge, la survenue d'évènements thrombotiques mais également le statut mutationnel de JAK2 sont des éléments pris en compte pour les classer selon les risques (tableau 2).

Tableau 3 : Classification des TE selon les facteurs de risques

	Très faible risque	Risque faible	Risque intermédiaire	Haut risque
Antécédent d'évènements thrombotiques	Non	Non	Non	oui
Age (<) ou (>) à 60 ans	<	<	>	>
Muté pour JAK2	Non	Oui	Non	oui

Les patients à très faible risque et sans facteur de risques cardiovasculaires sont des patients surveillés mais sans traitement particulier (Tefferi et Barbui 2020). L'aspirine est utilisée pour traiter les patients qui présentent des risques cardiovasculaires, qu'ils soient classés comme étant de faible risque ou non. Les patients de risque intermédiaire et de haut risque reçoivent de l'HU en première intention. L'anagrélide (ANA), un inhibiteur de l'AMP cyclique phosphodiesterase III ciblant la mégacaryopoïèse et donc la génération des plaquettes, peut être prescrit chez les patients de haut risque. En seconde ligne de traitement, tout comme dans le cas de la PV, les patients qui sont intolérants ou ne répondent pas à l'HU reçoivent de l'IFN α ou bien du busulfan (Tefferi et Barbui 2020).

c. Myélofibrose primaire (MFP)

Actuellement, il existe plusieurs systèmes pour évaluer le pronostic des patients atteints de MFP et les classer selon des facteurs de risques tels que le système MIPSSv2 (*mutation- and karyotype-enhanced international prognostic scoring system*) qui prend en compte les anomalies génétiques (mutations motrices, présence de mutations associées à pronostique défavorable, anomalies caryotypiques) et les facteurs de risques cliniques (taux de leucocytes, plaquettes, anémie, blastes circulants)(Tefferi et al. 2018).

Selon ces critères, il n'est pas recommandé d'orienter les patients classés de faible risque vers l'allogreffe qui est le seul traitement curatif du fait des risques de complications élevés de cette option (Kröger et al. 2015). Dans ce contexte, Tefferi évoque que l'observation simple de ces patients, en l'absence de symptôme qui requiert un traitement, est raisonnable puisqu'il n'y a pas d'efficacité prouvée des thérapies conventionnelles sur la survie de ces patients (Tefferi 2021). Les patients de risque intermédiaire ont des symptômes qui nécessitent un traitement. Dans la MFP les principaux symptômes à traiter sont l'anémie et la splénomégalie. L'anémie est traitée par androgène, fluoxymestérone, prédnisone ou lénalidomide. Pour traiter la splénomégalie, les patients reçoivent en première ligne de traitement l'HU qui permet une réduction de la taille de la rate de moitié dans 40% des cas. Les patients qui ne répondent pas à l'HU, vont être traités par Ruxolitinib qui permet également de réduire la splénomégalie et améliorer la qualité de vie des patients (Harrison et al. 2012). Plus récemment, un autre inhibiteur des JAK a été mis sur le marché (Fedratinib ou Inrebic) qui vient se substituer au Ruxolitinib en cas d'intolérance. En revanche, ces

inhibiteurs ont des effets délétères sur la maladie puisqu'ils peuvent induire une anémie et une thrombocytopénie.

Ces différents traitements permettent de traiter les symptômes mais n'ont pas d'effet sur l'évolution de la pathologie. Le seul traitement curatif (évoqué plus haut) est la transplantation allogénique de CSH qui est conseillée chez les patients de haut et très haut risque (mutations associées de mauvais pronostic, anomalies caryotypiques). Cependant, ce traitement est rarement proposé du fait des risques encourus étant donné l'âge des patients et des complications liées à la greffe ce qui rend un certain nombre de patients non éligibles (Ali et al. 2019). Les patients qui ne sont pas éligibles à l'allogreffe de CSH sont orientés vers les essais thérapeutiques qui incluent de nouveaux traitements émergents.

2. L'interféron alpha (IFN α)

L'interféron alpha (IFN α) fait partie de la superfamille des interférons. Ces cytokines ont été découvertes il y a 65 ans par Isaac et Lindenmann comme des substances libérées en présence du virus *influenza* inactivé et qui est responsable de l'interférence observée lors d'une seconde infection (Lindenmann, Burke, et Isaacs 1957). Ces protéines sont regroupées en 3 types : I, II et III et sont impliquées dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'inflammation et l'immunité adaptative. Ces cytokines sont utilisées dans un certain nombre de pathologies comme des maladies virales (hépatite C), des scléroses multiples ou des hémopathies malignes comme la LMC.

a. Traitement à l'IFN dans les NMP

L'interféron alpha est utilisée dans le traitement de diverses pathologies dont l'hépatite C, l'hépatite B mais également dans le traitement des LMC ainsi que dans les NMP (surtout les TE et les PV de sujets jeunes). Le traitement par l'IFN α dans les NMP (TE ou PV) induit une réponse hématologique (RH) dans environ 70% des cas ce qui est comparable notamment à l'HU (Silver 1988; Yacoub et al. 2019; Yin et al. 2022). Les patients traités à l'IFN α présentent moins de complications liées à la progression de la maladie (événements thrombotiques, splénomégalie, myélofibrose) et nécessitent moins de saignée (Yin et al. 2022). L'IFN α est un traitement prometteur dans les NMP car il est capable d'induire en plus d'une RH, une réponse moléculaire (RM) dans le sang. En revanche la réponse au traitement est très hétérogène entre les patients. Plusieurs études observent une RM dans plus de 60% des cas avec une réponse moléculaire complète (RMC) (mutations indétectables) chez 20% des patients qui portent la mutation JAK2^{V617F} (Kiladjian et al. 2008; Quintás-Cardama et al. 2013). Chez certains de ces patients en RMC, l'arrêt du traitement est possible sans reprise des symptômes (Daltro De Oliveira et al. 2020) . Les effets de l'IFN α chez les patients qui portent des mutations de *CALR* sont plus controversés (Czech et al. 2019; Kjær et al. 2016; Verger et Cassinat 2015).

En plus des mutations motrices, les études montrent que la présence de mutations associées peut impacter la réponse au traitement à l'interféron. Par exemple, la présence de mutations TET2 chez certains patients est associée avec une réponse moléculaire moins importante tout comme la présence des mutations ASXL1, EZH2 ou bien encore de DNMT3A (Knudsen et al. 2022; Quintás-Cardama et al. 2013; Verger et Cassinat 2015). Enfin, des variants

germinaux en particulier sur le gène codant pour IFN λ sont également capables d'impacter la réponse moléculaires à l'IFN (Jäger et al. 2021).

Un des problèmes majeurs de ce traitement est qu'il induit de nombreux effets indésirables (fatigue, dépression, symptômes grippaux, problèmes intestinaux) qui peuvent conduire à une forte intolérance chez 10-20% de patients et donc à l'arrêt du traitement. L'IFN α étant une molécule dont la demi-vie dans le sang est assez courte, demandait une administration très fréquente. Néanmoins, le développement de l'IFN pégylé (l'IFN- α -2a pégylé), une forme stabilisée de l'IFN α permet une administration espacée aux patients. Récemment le développement d'un IFN encore plus stable et plus actif que l'IFN α pégylé, le ropeg-interféron (Besremi) permet d'espacer encore plus les injections ce qui diminue les effets indésirables et augmente la tolérance des patients au traitement (Gisslinger et al. 2015). Une étude récente montre aussi sa meilleure efficacité comparée à l'HU sur la RH et la RM à long terme (>5 ans) et il a été autorisé par la FDA (agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux) dans le traitement de la PV (Kiladjian et al. 2022).

b. Signalisation de l'IFN

i. Les interférons de type I, II et III

Les interférons de type I sont les plus étudiées et les mieux caractérisées parmi les 3 types d'interférons. Cette famille regroupe l'IFN α (composée de 13 sous-types : α 1, α 2, α 4, α 5, α 6, α 7, α 8, α 10, α 13, α 14, α 16, α 17 et α 21), l'IFN β , l'IFN ϵ , l'IFN κ , et l'IFN ω . L'IFN α et β sont les IFN prédominants qui sont sécrétés par de nombreux types cellulaires en présence de PAMP (Motifs moléculaires associées aux pathogènes). Ces cytokines se fixent sur un récepteur hétérodimérique exprimé de façon ubiquitaire (Constantinescu et al. 1995). Ce récepteur est composé de deux sous-unités : IFNAR1 et IFNAR2 et sont associées respectivement aux tyrosines kinases TYK2 et JAK1 au niveau de leur domaine intracellulaire. La fixation de l'IFN α sur ce récepteur va induire l'activation de TYK2 et JAK1 qui vont phosphoryler le récepteur et induire le recrutement des STAT. Une fois recrutées, STAT1 et STAT2 sont phosphorylées respectivement au niveau des tyrosines Y701 et Y690 et sont donc activées. Elles vont alors former des hétérodimères STAT1/STAT2 et interagir avec IRF9 (*Interferon Regulatory Factor 9*). Ce complexe nommé ISGF3 (*IFN Stimulated Gene Factor 3*) va pouvoir migrer dans le noyau et se fixer sur des séquences promotrices spécifiques nommées ISRE (*IFN Stimulated*

Response Element). La fixation d'ISGF3 sur ces régions de l'ADN permet d'induire la transcription des gènes cibles de l'IFN (ISG : *Interferon Stimulating Genes*) (figure 16).

L'IFN de type II ou IFN γ est sécrétée en majorité par les cellules du système immunitaire. Cette cytokine forme un homodimère et se fixe sur son récepteur IFNGR. IFNGR est composé de 2 sous-unités IFNGR1 et deux sous-unités IFNGR2 qui sont exprimées de façon ubiquitaire. Sa fixation sur son récepteur va induire l'activation des Janus kinases JAK1 et JAK2 conduisant au recrutement des facteurs de transcription STAT1. Ceux-ci forment des homodimères qui vont transloquer dans le noyau et se fixer sur les régions promotrices GAS (*Gamma IFN-Activated Site*) pour induire la transcription d'ISG (figure 18).

Les IFN de type III regroupent les IFN λ 1, λ 2, λ 3 et λ 4 qui se fixent de façon spécifique sur les récepteurs IL10R2 et IFNLR1. Cette famille d'IFN a une activité similaire aux IFN de type I en activant les mêmes tyrosines kinases TYK2 et JAK1, la formation du complexe ISGF3 et l'activation de la transcription des ISG. En revanche, la sous unité IFNLR1 est exprimée uniquement au niveau des cellules endothéliales.

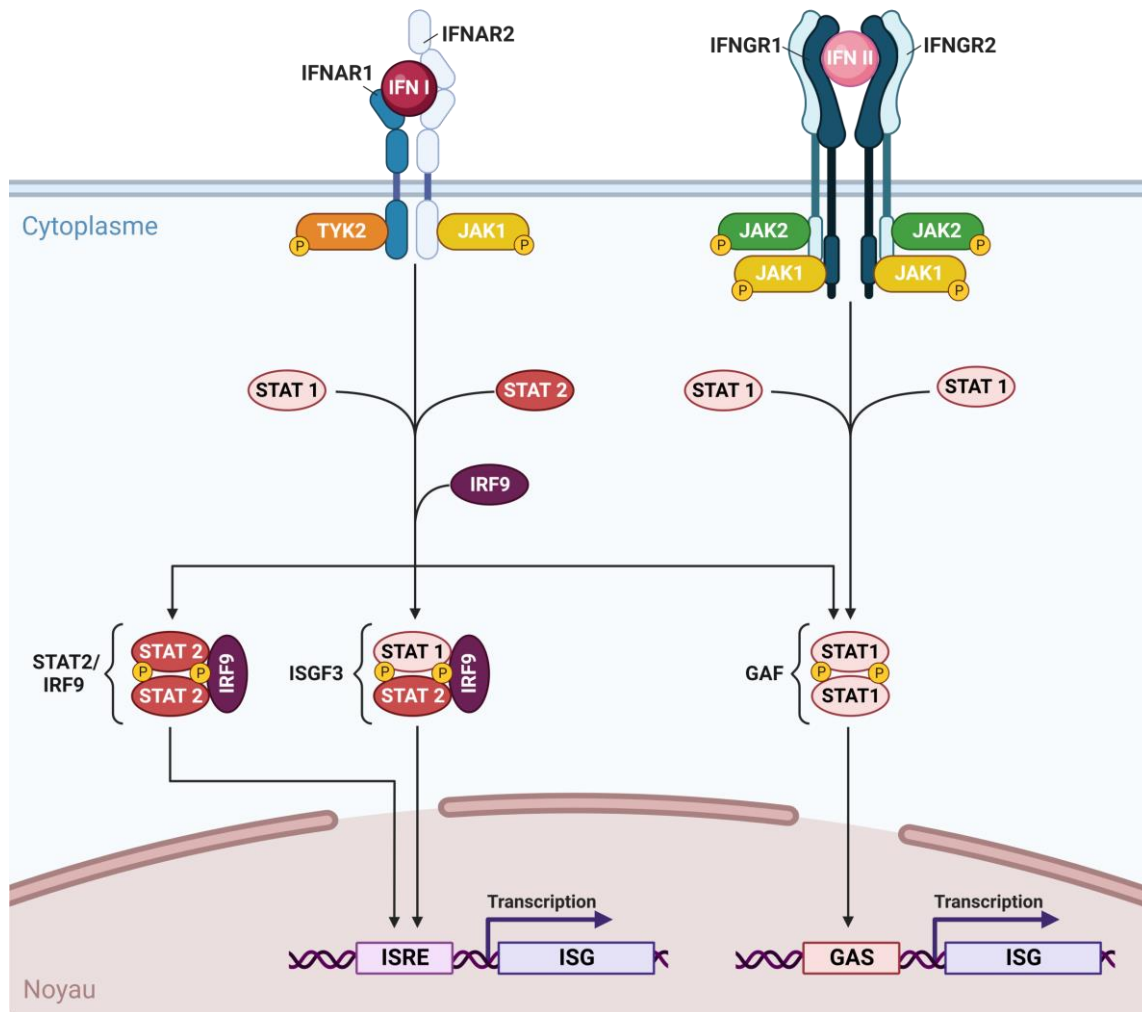


Figure 18 : Voie de signalisation des IFN de type I, II et III (Michalska et al. 2018)

Voies de signalisation médiées par l'IFN de type I et de type II. Ces cytokines induisent l'activation des tyrosines kinases JAK1 et TYK2 (IFN de type I) ou JAK1 et JAK2 (IFN de type II). Les Janus kinases phosphorylées induisent la phosphorylation des STAT et ainsi la formation de complexe STAT2/IRF9, ISGF3 et GAF qui vont ensuite transloquer dans le noyau. Ces complexes jouent le rôle de facteur de transcription et vont se fixer sur des régions promotrices de l'ADN spécifiques nommées ISRE ou GAS pour induire la transcription des ISG.

Les IFN de type I induisent majoritairement la formation d'hétérodimères STAT1/STAT2 pour former le complexe ISGF3, mais il peut également y avoir formation d'homodimères STAT1 ou STAT2. Les homodimères STAT2 sont capables de former un complexe avec IRF9 tout comme l'hétérodimère STAT1/STAT2 et se fixe également sur les séquences ISRE. Les homodimères de STAT1 appelés également GAF (*Gamma Activated Factor*) se fixent sur les séquences GAS, bien que la formation de ces complexes soit minoritaire puisqu'ils sont en compétition avec le complexe ISGF. L'IFN de type I est donc capable d'induire des ISG sous le contrôle de séquence GAS.

Les modèles de souris qui n'expriment pas IFNAR1 (IFNAR^{-/-}) ne sont pas capables de répondre aux IFN de type I démontrant le rôle essentiel de ce récepteur dans la médiation du signal par les IFN de type I. Le KO d'IFNAR1 rend les souris incapables de combattre une infection virale. Bien que les IFN de type I et II ont des signaux d'activation de transcription de gènes qui se recouvrent partiellement, la comparaison de ce modèle de souris dépourvu de récepteur IFNAR1 et IFNGR montrent que ces deux types d'interféron sont essentiels à la défense antivirale et ne sont pas redondants sur le plan fonctionnel (Müller et al. 1994).

ii. Inhibition de la signalisation à l'IFN

L'IFN de type I conduit à l'expression de gènes codant pour des protéines aux propriétés antivirales, antiprolifératives, pro-apoptotiques et pro-inflammatoires. Il existe différents mécanismes à plusieurs échelles temporelles qui collaborent pour arrêter l'expression de ces gènes quelques heures après l'exposition des cellules à l'IFN. Lorsque l'IFN se fixe sur son récepteur, celui-ci est rapidement internalisé par endocytose et dégradé. Les protéines de la famille SOCS (*Suppressor of Cytokine Signalling*) en particulier SOCS1 permettent d'inhiber rapidement la signalisation médiée par l'IFN en se fixant sur les JAK phosphorylées. La protéine PIAS1 permet d'inhiber la phosphorylation de STAT1 et l'IFN α induit lui-même une boucle de rétrocontrôle négatif puisqu'on trouve parmi les ISG des inhibiteurs de ces voies (notamment les SOCS mais aussi ISG15, USP18). Ce dernier est une ubiquitine specific peptidase (USP) qui se fixe à IFNAR2 et qui induit un changement conformationnel du récepteur permettant de dissocier l'IFN α .

iii. Signalisation prolongée de l'IFN (U-ISGF3)

Bien que les STAT soient rapidement déphosphorylées après stimulation par l'IFN de type I et II, Cheon et *al.* ont montré dans des lignées de cellules épithéliales que l'activation de l'expression de certains ISG persiste plusieurs jours après l'arrêt de la stimulation des cellules par l'IFN. De plus, la protéine STAT1 non phosphorylée (U-STAT1) s'accumule plusieurs jours après l'arrêt de la stimulation et est localisée dans le noyau, ce qui suggère un rôle de la protéine STAT1 non phosphorylée (Cheon et Stark 2009). À l'aide d'un mutant dominant négatif de STAT (STAT1^{Y701F}) qui ne peut pas être phosphorylé et donc non actif, les auteurs ont montré que l'accumulation d'U-STAT1 était capable d'induire l'expression de certains ISG. Par la suite, il a été montré que l'action de U-STAT1 nécessite la présence d'IRF9 et STAT2 (U-ISGF3), mais que STAT2 et IRF9 seul sont aussi capables de transloquer dans le

noyau pour induire l'expression d'ISG en l'absence de stimulation à l'IFN (Cheon et al. 2013; W. Wang et al. 2017). Ces données montrent qu'il y a plusieurs niveaux de réponse à l'IFN (figure 19). Dans un premier temps, une réponse rapide qui passe par l'activation des STAT et qui permet d'activer une large gamme d'ISG. Dans un second temps, une accumulation des STAT/IRF9 mais aussi l'expression d'IRF1 permettent d'induire la transcription d'un sous-groupe d'ISG et de maintenir une réponse à l'IFN prolongée. La plupart des gènes induits par U-ISGF3 codent pour des protéines qui ont des propriétés antivirales et qui sont impliquées dans la régulation du système immunitaire. Parmi eux, on retrouve *IFI27*, *BST2*, *OAS1*, *OAS2*, *OAS3*, *ISG15* et *STAT1* lui-même (Cheon et Stark 2009; Cheon et al. 2013; Sung et al. 2015).

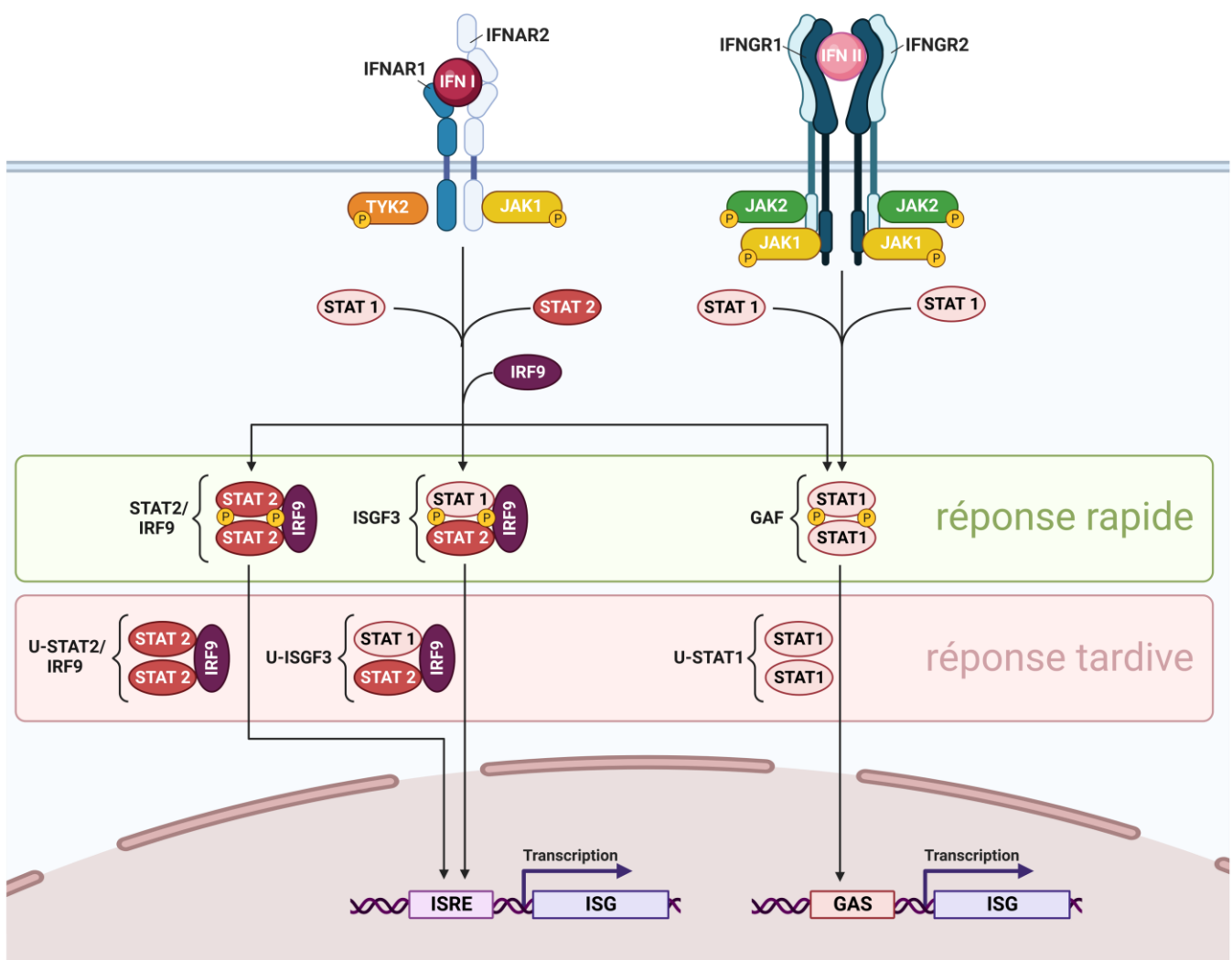


Figure 19 : Les différents niveaux de réponse à l'IFN de type I et II (Michalska et al. 2018)

Classiquement, la signalisation à l'IFN de type I et II est décrite comme une réponse rapide qui passe par la phosphorylation des STAT, la formation de complexe et la transcription des ISG dont les STAT. Il y a alors une accumulation de protéines STAT non phosphorylées dans la cellule qui peuvent également former des complexes U-STAT2/IRF9, U-ISGF3, U-STAT1. Ces complexes transloquent dans le noyau et induisent la transcription de certains ISG à plus long-terme.

c. Conséquences de l'IFN α et effet sur les CSH

i. Réponse immunitaire :

Les premières études menées sur des modèles de souris traitées à l'IFN α ont montré l'importance des mécanismes immunitaires de l'hôte dans la génération de réponses antibactériennes, antivirales et antitumorales de longue durée. Globalement, l'IFN α accroît les fonctions des cellules T et NK en augmentant leur production d'IFN γ , favorise la production de NO par les macrophages et la maturation des cellules présentatrices d'antigènes, induisant une immunité des cellules T et B et contribuant à la génération de lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Il renforce la réponse humorale aux antigènes solubles, favorise le changement de classe des immunoglobulines et augmente l'effet des LPS (Decker, Müller, et Stockinger 2005).

ii. Réponse apoptotique :

L'IFN favorise l'apoptose de divers types de cellules tumorales impliquant l'activation de plusieurs ISG (\approx 15 sont identifiés, dont la caspase 4, la caspase 8, TRAIL, Fas/CD95, XIAP). Elle est indépendante de l'arrêt du cycle cellulaire et implique principalement les voies PI3K/mTOR et JAK/STAT (Chawla-Sarkar et Lindner, s. d.).

iii. Réponse antiproliférative :

L'IFN α supprime la prolifération des cellules progénitrices hématopoïétiques. Il peut agir directement sur les progéniteurs hématopoïétiques en induisant l'apoptose dépendante de p38 MAPK et BAX. Il agit également indirectement sur les progéniteurs hématopoïétiques en induisant la production d'IFN γ par les cellules accessoires de la moelle et en inhibant la production paracrine de plusieurs facteurs de croissance. Enfin, il atténue la signalisation JAK/STAT déclenchée par les récepteurs de cytokines comme MPL en augmentant l'expression de SOCS-1 et en induisant une thrombocytopenie (Aman et al. 1994; Lu et al. 2010; Q. Wang et al. 2000).

Ces 2 dernières réponses sont en partie dues au fait que l'IFN α est un puissant inducteur de l'expression de la protéine de leucémie pro-myélocytaire (PML), qui est l'organisateur clé des corps nucléaires (CN-PML). Ces structures sont non seulement essentielles pour l'activité de l'IFN, mais aussi importantes pour médier l'action des espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui entraîne la sumoylation, la séquestration et la dégradation des protéines (Sahin et al.

2014). Par conséquent, la formation des CN-PML induit de nombreuses activités cellulaires en aval telles que la sénescence, l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire principalement suite à l'activation de P53 (Bernardi et Pandolfi 2007; Sahin, Lallemand-Breitenbach, et de Thé 2014).

iv. Réponse proliférative

De nombreuses études ont montré que l'IFN était impliqué au niveau des CSH et notamment dans l'auto-renouvellement et la quiescence de ces cellules. Des expériences *in vivo* chez la souris du groupe de Essers *et al.* ont montré que l'IFN α administré de façon aiguë est capable d'induire la sortie de quiescence des CSH qui deviennent actives. Ceci est corrélé à la phosphorylation de STAT1, d'AKT et augmente l'expression d'ISG dont le marqueur Sca-1 (*stem cell antigen 1*). Enfin, l'axe IFNAR/Stat1/Sca-1 est responsable de la prolifération des CSH puisque la sortie de quiescence des CSH est abolie dans les souris dépourvues de STAT1, IFNAR1 ou Sca-1. Ces résultats démontrent l'effet direct de l'IFN *via* l'activation de son récepteur et les cascades de signalisation en aval (Essers et al. 2009). De plus, cette même équipe montre que l'exposition chronique à l'IFN α compromet de façon élevée la fonction des CSH en inhibant leur autorenouvellement et en favorisant leur mise en différenciation en progéniteurs. Ces résultats suggèrent que l'activation du cycle cellulaire des CSH par l'IFN épuise le pool de CSH (figure 20).

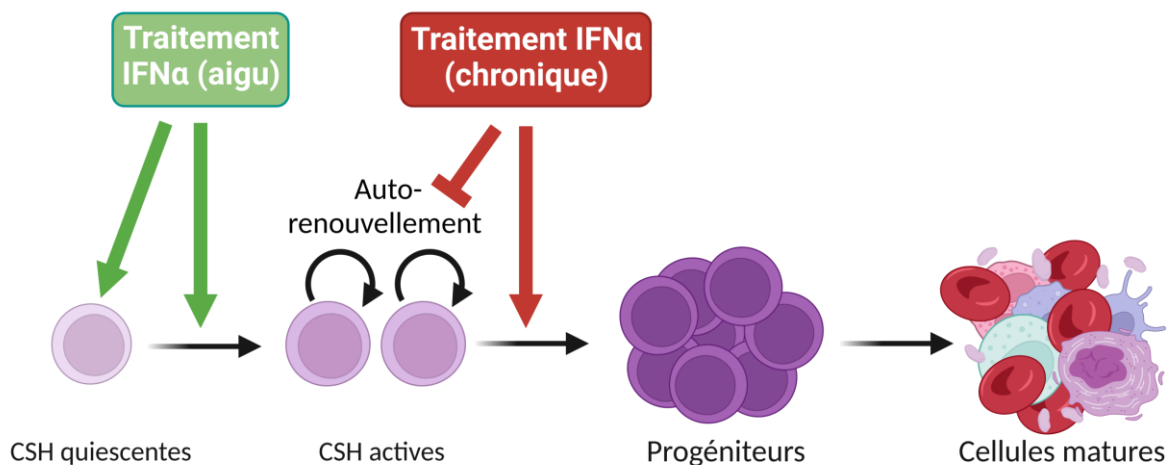


Figure 20 : Effet de l'IFN α sur les CSH (adapté de Essers et al., 2009)

Un traitement à l'IFN aigu et de courte durée est capable d'induire la sortie de quiescence de CSH et ainsi augmenter l'autorenouvellement de ces cellules et leur mise en différenciation. Un traitement chronique à l'IFN α bloque l'autorenouvellement des CSH en cycle, favorise leur mise en différenciation.

Walter *et al.* ont aussi montré que le stress aiguë par IFN α induit la prolifération des CSH *via* l'induction de ROS et la génération de dommages à l'ADN. De plus, ils n'observent pas de diminution des CSH mais une altération de leurs fonctions comme Essers *et al.* (Walter et al.

2015). Une autre équipe a montré qu'un traitement chronique à l'IFN α induit un épuisement des CSH WT en compétition avec des CSH IRF2^{-/-} en induisant leur mise en différenciation et inhibant l'autorenouvellement de ces cellules (Sato et al. 2009). Leurs résultats ont également montré que l'IFN α diminue de façon importante l'expression de *P27* et *P57* qui sont des inhibiteurs de CDK (*cyclin dependant kinase*) impliqués dans la régulation du cycle cellulaire. En parallèle ils ont déterminé que l'expression de *c-MPL* (qui code pour le récepteur à la TPO) joue un rôle important pour le maintien des CSH à l'état de quiescence, diminue dans les CSH IRF2^{-/-} mais est restauré dans les CSH IRF2^{-/-}/IFNAR1^{-/-} suggérant que la suractivation par l'IFN α diminue la quiescence.

Par la suite, Pietras *et al.* ont montré que la prolifération induite par une exposition chronique *in vivo* à l'IFN chez la souris n'épuise pas le pool de CSH suite à un retour rapide en quiescence. Ceci se fait *via* la diminution transitoire de l'activité de certaines voies (*P27*, *P57*, *Foxo1*, *Foxo3A* et *PTEN*, la voie *NOTCH* et *TGF β*) impliquées dans le maintien des CSH à l'état de quiescence. Le retour à la quiescence est donc un mécanisme de sauvegarde qui protège les CSH de l'effet délétère direct de l'IFN. En revanche, ces CSH remises en quiescence sont préparées à subir plus rapidement l'apoptose dépendante de *P53* quand les cellules recommencent à proliférer suite à une culture *in vitro*, suite à une transplantation ou suite à un traitement myéloablatif (Pietras et al. 2014) (figure 21).

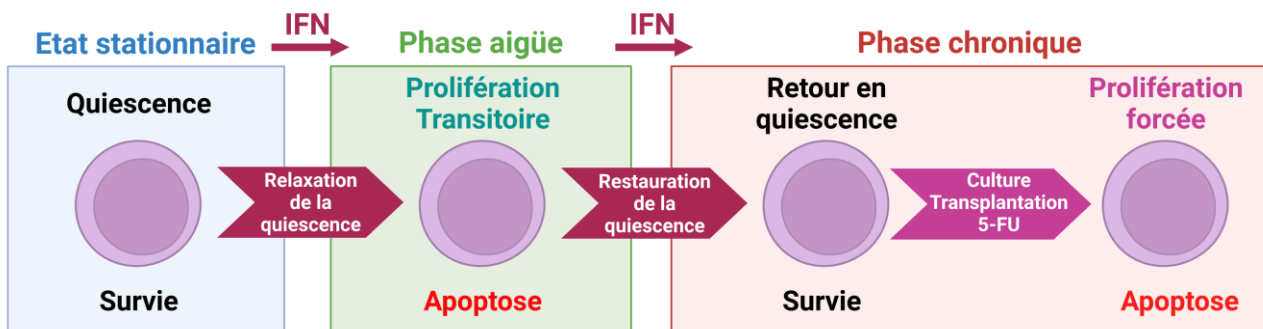


Figure 21 : Quiescence, un mécanisme de protection des CSH contre l'effet apoptotique de l'IFN (adapté de Pietras et al., 2014)

Modèle expliquant comment le retour à l'état de quiescence protège les CSH de l'apoptose induite par l'IFN. Les CSH sont normalement maintenues dans un état quiescent protégées des stimuli pro-apoptotiques. L'IFN induit les CSH à entrer dans le cycle cellulaire (phase aiguë) où elles sont vulnérables à l'apoptose en raison d'une relaxation transitoire des mécanismes de quiescence. Lors d'une exposition chronique à l'IFN (phase chronique), les CSH reviennent à un état de quiescence où elles sont protégées de l'apoptose induite par l'IFN. En revanche, si elles sont forcées de retourner dans le cycle cellulaire (culture, transplantation, 5-FU), elles activent un programme de gènes pro-apoptotiques dépendant de *p53*.

d. Effet de l'IFN α dans les NMP

i. Au niveau des CSH

Ces dernières années, de nombreuses études ont émergé dans le but de déterminer par quel mécanisme l'IFN α agit pour induire une RMC chez certains patients et pas d'autres en vue d'améliorer ce traitement. Des études initiales chez la souris menées par notre laboratoire et dans l'équipe de B. Ebert (Boston) ont montré que l'IFN α est capable de cibler les cellules JAK2^{V617F} au niveau des cellules matures mais également au niveau des cellules souches et progénitrices dans un modèle de greffe en compétition cellules normales/cellules JAK2^{V617F} (Salma Hasan et al. 2013; Mullaly et al. 2013). Mullaly *et al.* ont montré notamment que l'IFN α était capable d'induire une sortie de quiescence et une mise en cycle cellulaire plus importante des CSH JAK2^{V617F} par rapport aux cellules WT. De cette façon, l'IFN α entraîne un épuisement des CSH JAK2^{V617F}.

Plus récemment, Rao *et al.* déterminent dans leur modèle de souris JAK2^{V617F}, mais également chez les patients, une augmentation d'une sous population de CSH exprimant fortement le marqueur CD41 (CSH CD41^{high}) qui est un marqueur des CSH biaisées vers la lignée mégacaryocytaire. Les analyses transcriptomiques et de cytométrie montrent que ces cellules sont plus en cycle par rapport à celles qui expriment peu le CD41 (CSH CD41^{low}) qui comportent des caractéristiques de cellules à l'état de quiescence. Dans leur étude, au cours du traitement à l'IFN α , ils observent une augmentation de la fréquence et du pourcentage de CSH CD41^{high} qui corrèle avec la diminution des CSH JAK2^{V617F} (Rao et al. 2021), suggérant que l'IFN α induit la mise en cycle des CSH CD41^{high} JAK2^{V617F}.

Une autre étude observe également la présence d'une population de CSH CD41⁺ chez les patients atteints de NMP en particulier chez les patients TE (Tong et al. 2021). Ces études suggèrent finalement que la mutation JAK2^{V617F} donnerait un avantage au niveau des CSH biaisées vers la lignée mégacaryocytaire conduisant à une expansion de cette population de CSH. Ces cellules seraient plus sensibles à l'IFN α car elles expriment à l'état basal des protéines effectrices de la signalisation par IFN α . De plus par une analyse scRNA-seq des progéniteurs de patients, Tong *et al.* ont pu pointer le mécanisme d'action de l'IFN : il induit une mise en quiescence des CSH biaisées mégacaryocytaires JAK2^{V617F} homozygotes et l'apoptose des CSH biaisées mégacaryocytaires JAK2^{V617F} hétérozygotes (Tong et al. 2021) (figure 22).

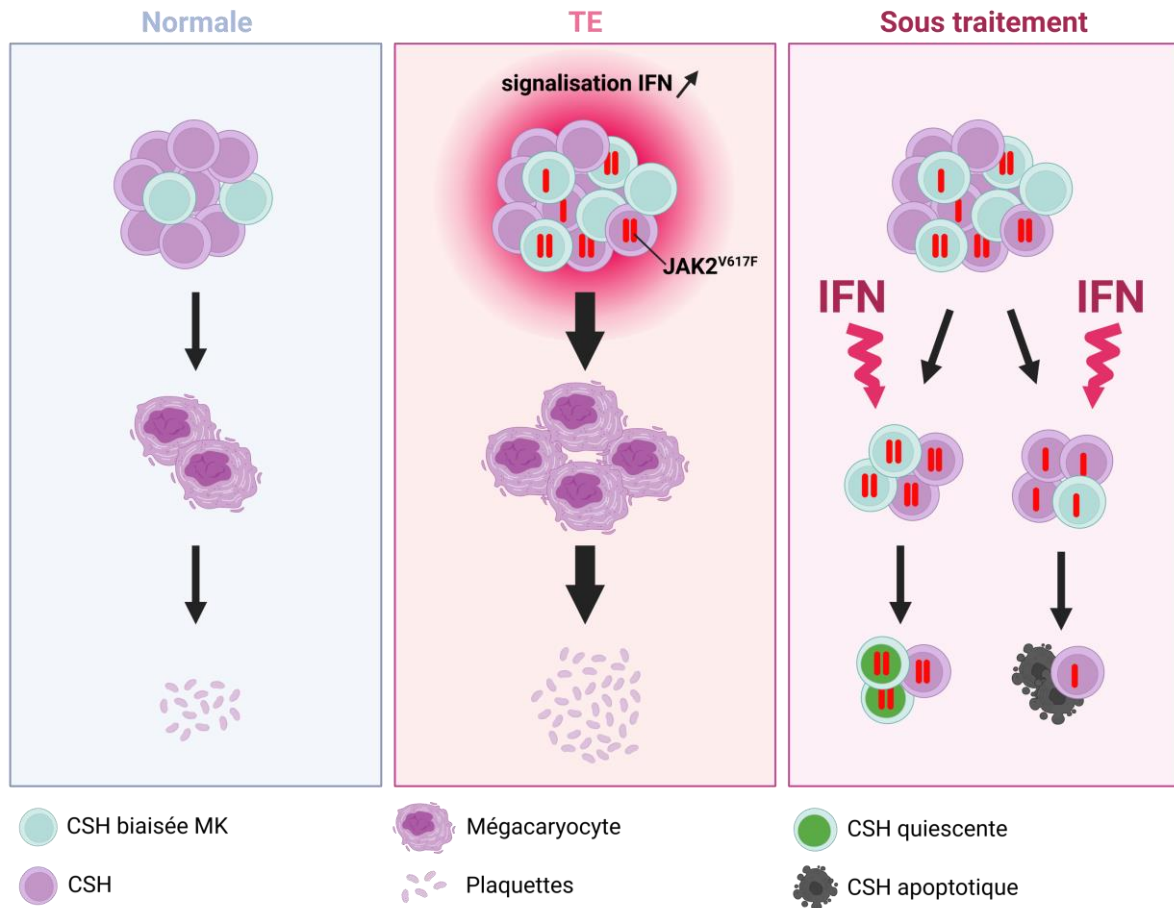


Figure 22 : Mécanismes d'éradication des CSH CD41^{high} JAK2^{V617F} (adapté de Tong et al., 2021)

Dans un contexte normal, les CSH présentent une sous population biaisée vers la lignée mégacaryocytaire. Au cours de l'initiation de la TE, la mutation JAK2^{V617F} présente au niveau de cette sous population induit une augmentation de ces CSH et conduit au développement de la maladie avec une amplification de la lignée mégacaryocytaire. Le traitement des patients induit l'apoptose des CSH JAK2^{V617F} hétérozygotes et un retour en quiescence des cellules homozygotes pour JAK2^{V617F}.

Ces études mettent en évidence différents mécanismes qui expliquent l'effet de l'IFN α de façon spécifique sur les CSH JAK2^{V617F}.

ii. Mécanismes impliqués :

À l'aide de lignée cellulaire qui surexprime JAK2^{V617F} ou CALR^m, Czech et al. ont montré que selon la mutation, la sensibilité à l'IFN α *in vitro* est différente. L'IFN α induit une diminution de la prolifération et un effet modéré sur l'apoptose de ces cellules de façon dose dépendante. De manière intéressante, les effets de l'IFN α sont observés à des doses plus faibles en présence de JAK2^{V617F} (100 UI/ml) comparées aux cellules CALR^m (500 UI/ml). De plus les lignées JAK2^{V617F} ont une activation constitutive de STAT1 et de JAK1 ce qui montre que JAK2^{V617F} sensibilise à l'IFN α de manière plus importante que CALR^m. Ils observent une expression basale de STAT1 et STAT2 plus importante dans le cas de JAK2^{V617F} ainsi qu'une

augmentation de la phosphorylation des STAT 1, 2 et 3 après stimulation à l'IFN α . Par ailleurs, l'expression des ISG est augmentée en réponse à l'IFN α dans les lignées JAK2^{V617F} par rapport aux lignées CALR^m. Cette observation est également retrouvée dans les cellules mononuclées (CMN) provenant de patient JAK2^{V617F} en comparaison aux patients CALR^m. Pour confirmer que les différences observées en réponse à l'IFN α entre JAK2^{V617F} et CALR^m sont dues à une augmentation de la phosphorylation de STAT1, ils ont surexprimé STAT1 dans leurs lignées et comparé avec la surexpression d'un dominant négatif de STAT1 (STAT1^{Y701F}). Ils ont pu montrer ainsi que la surexpression de STAT1 dans les lignées CALR^{del52} permet de sensibiliser les cellules à l'IFN α à des niveaux comparables aux cellules JAK2^{V617F}. Au contraire, la surexpression de STAT1^{Y701F} diminue la réponse à l'IFN α dans les lignées JAK2^{V617F} (Czech et al. 2019). De manière intéressante, Tong et al. constatent également une augmentation de la phosphorylation de STAT1 (P-STAT1) en particulier au niveau des CSH CD41⁺ provenant de patients NMP (Tong et al. 2021). Ces résultats sont en accord avec une précédente étude qui montre une augmentation de P-STAT1 dans les CSH JAK2^{V617F} de souris après traitement à l'IFN α (Austin et al. 2020).

Par ailleurs, Austin et al. ont démontré dans un modèle de souris JAK2^{+V617F} que l'IFN α induit un épuisement des LT-HSC portant la mutation. Dans leur modèle de souris, un traitement aigu à l'IFN α induit une réponse similaire entre les cellules WT et JAK2^{V617F} dans les LT-CSH et MPP avec une augmentation de la sortie de quiescence, de la production de ROS ainsi qu'une augmentation des dommages à l'ADN. En traitant ces souris de façon chronique à l'IFN α pégylé, ils observent une normalisation des paramètres sanguins ainsi qu'une diminution du chimérisme JAK2^{V617F}. De manière intéressante, le traitement chronique à l'IFN α induit au niveau des LT-CSH JAK2^{+V617F} une diminution plus importante de la quiescence, une accumulation des cellules en phase G1 ainsi qu'une augmentation des ROS et des dommages à l'ADN par rapport aux LT-CSH JAK2^{WT}. Ces données montrent que les LT-CSH JAK2^{WT} et JAK2^{+V617F} ont une cinétique d'activation équivalente en réponse à un traitement aigu à l'IFN α . En revanche l'activation de la signalisation *via* P-STAT1 est plus importante dans les LT-CSH mutées et la réponse au traitement chronique à l'IFN α dans les LT-CSH JAK2^{+V617F} est plus importante. Cette étude donne une explication du mécanisme de réponse moléculaire chez les patients NMP JAK2^{V617F} après un traitement à l'IFN α sur le long terme (Austin et al. 2020).

Enfin, il a été rapporté que le traitement des CD34⁺ de PV par peg-IFN α -2a induit une augmentation de l'apoptose de ces cellules ainsi que l'activation de p38 MAPK (Lu et al. 2010). Ces auteurs ont également montré que le traitement *in vitro* de CD34⁺ de patients induit l'activation de STAT1 et favorise la transcription de P53 (Lu et al. 2012). Plus récemment, l'activation de p38 MAPK en réponse à l'IFN α a été montrée comme dépendante de l'activation de PKC δ ainsi que d'AKT/mTORC1. L'activation de ces deux voies induit la phosphorylation d'ULK1 nécessaire à l'activation de p38 MAPK et contribue à la transcription d'ISG permettant d'inhiber la prolifération et la survie des cellules NMP. En parallèle, l'IFN α induit l'activation des caspases qui contribuent à l'apoptose des cellules NMP. En revanche, ce mécanisme induit également une boucle de rétrocontrôle négatif *via* le clivage de ROCK1/2 qui peut alors s'associer à ULK1 et ainsi promouvoir la prolifération et la survie des cellules NMP (Saleiro et al. 2022).

OBJECTIF

Durant ces dernières années, de nombreuses études ont montré l'impact du traitement à l'IFN α chez les patients NMP. Bien qu'il ait été montré que ce traitement est capable de cibler les cellules initiatrices de la maladie, son mécanisme d'action reste incompris surtout chez l'Homme. De plus, de nombreux patients sont intolérants au traitement ou ne répondent pas de façon hématologique. Il est donc important de comprendre son mécanisme d'action afin de pouvoir l'améliorer et également cibler un plus grand nombre de patients notamment à l'aide de combinaison de traitement ou grâce à une posologie mieux adaptée. L'objectif de ma thèse est donc de comprendre le mécanisme d'action de l'interféron α . Pour tenter de répondre en partie à cette problématique, je me suis centrée sur 3 objectifs spécifiques au cours de ma thèse :

- 1- Déterminer l'effet de l'IFN α sur les différents compartiments de l'hématopoïèse de patients NMP en fonction des mutations motrices.
- 2- Déterminer l'effet de l'IFN α chez les patients en fonction des mutations associées de *DNMT3A*, *P53* et *TET2*.
- 3- Étudier la signalisation de l'IFN α dans un contexte JAK2^{V617F} en comparaison à CALR^m dans les lignées cellulaires murines mais également dans les progéniteurs de patients.

RÉSULTATS

PARTIE 1 : ÉTUDE DE L'EFFET DE L'INTERFÉRON ALPHA SUR LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS DE L'HÉMATOPOÏÈSE CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS DE NMP (MOSCA ET AL. 2021)

Les NMP sont des hémopathies malignes causées par des mutations motrices de JAK2, CALR et MPL. L'IFN α montre une certaine efficacité chez les patients pour cibler les cellules portant la mutation motrice et conduit à une RM dans le sang. En revanche, la réponse au traitement est très hétérogène entre les patients. Afin de déterminer quels sont les paramètres qui peuvent influencer la réponse au traitement chez les patients, nous avons réalisé une étude sur une cohorte prospective pendant 5 ans de 48 patients atteints de TE, PV ou MFP et traités à l'IFN α . Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans Blood en 2021 où je signe en co-premier auteur (Mosca et al. 2021). Au cours de cette étude, nous avons déterminé l'architecture clonale environ tous les 3 mois des mutations motrices JAK2^{V617F}, CALR^m ou MPL^{W515K} dans les différents compartiments des progéniteurs des plus immatures (CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺) aux plus engagés (CD34⁺, CD38⁺, CD90⁻) ainsi que dans les cellules matures (granulocytes ou PNN). À partir de ces données nous avons montré que les progéniteurs JAK2^{V617F} sont éliminés lentement au cours du temps chez les patients traités par IFN α alors que les progéniteurs CALR^m sont moins bien ciblés et surtout de façon plus hétérogène. En outre, l'IFN α cible plus rapidement les progéniteurs JAK2^{V617F} à des doses élevées et est plus efficace contre les progéniteurs homozygotes que contre les progéniteurs hétérozygotes.

Cette étude a été initiée en 2014 au cours de la thèse de Matthieu Mosca qui a produit une grande partie des données expérimentales à partir d'échantillons de sang de patients. J'ai commencé à participer à cette étude en 2017 au cours de mon stage de master 1 où j'ai participé à la détection des mutations CALR atypiques de certains patients. J'ai poursuivi le travail de Matthieu lorsque je suis arrivée en thèse en 2018. Pour aller plus loin, nous avons analysé nos données à l'aide d'un modèle mathématique couplé à une analyse hiérarchique bayésienne. Cette partie a été réalisée au cours de ma thèse en collaboration avec le laboratoire du Pr. Paul Henry Cournède et de Gurvan Hermange, étudiant en thèse dans son laboratoire.

Ce modèle mathématique a permis d'extrapoler les effets du traitement sur les progéniteurs et les cellules matures à long-terme (3000 jours) y compris pour les patients rarement échantillonnés. De plus, ce modèle a permis de simuler la dynamique des CSH dont l'accès est impossible chez l'Homme. Ainsi, ce modèle reproduit parfaitement les dynamiques des progéniteurs et des cellules matures et montre que l'IFN α épuise progressivement les CSH JAK2^{V617F} en induisant leur sortie de la quiescence et leur différenciation en progéniteurs, ce qui est plus efficace avec une dose élevée d'IFN α et contre les CSH mutées homozygotes que contre les CSH mutées hétérozygotes (figure 23). De plus, nous avons constaté que la réponse moléculaire sur les CSH CALR^m diffèrent entre les mutations de type 1 et de type 2 et qu'une dose élevée d'IFN α chez ces patients a un effet délétère mais qui pourrait être dû à un facteur confondant comme l'amplification des clones CALR^m au cours de la maladie même sans traitement. Notre étude indique donc que l'efficacité moléculaire de l'IFN α à long terme résulte d'un épuisement des CSH mutées. Son efficacité dépend de la mutation motrice et également de la dose d'IFN α .

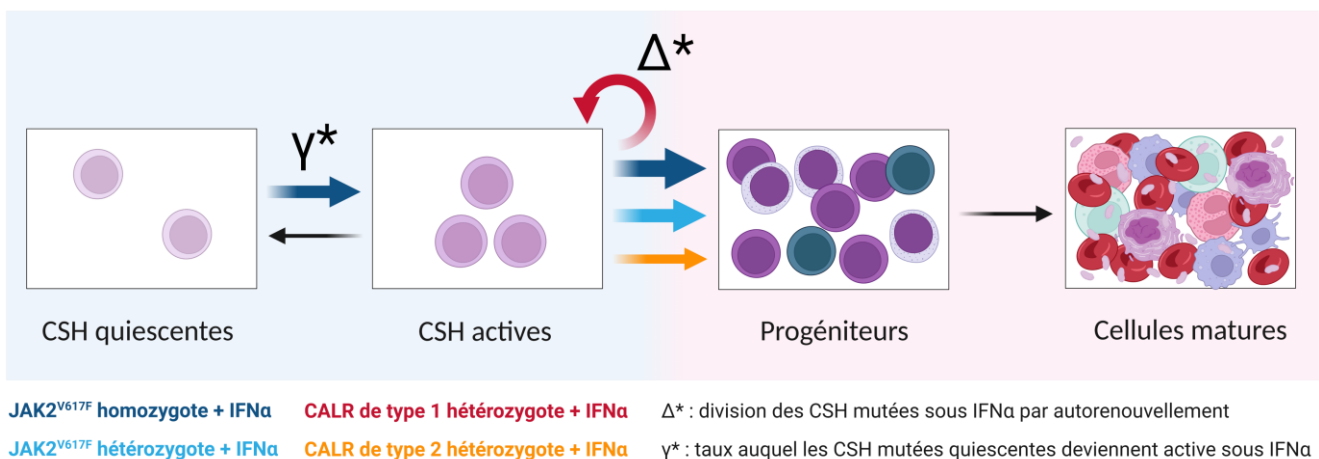
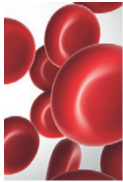


Figure 23 : Effets de l'IFN α sur les CSH mutées le modèle mathématique

Représentation schématique des effets de l'IFN α sur les cellules mutées JAK2^{V617F} hétérozygotes ou homozygotes et les mutations CALR^m de type 1 ou 2 dans les différents compartiments de l'hématopoïèse. Le paramètre γ^* représente la sortie de quiescence et le paramètre Δ^* l'effet de l'IFN α sur l'autorenouveaulement de ces cellules. Le modèle mathématique permet de prédire que l'IFN α induit une sortie de quiescence des CSH mutées en particulier pour les CSH JAK2^{V617F} homozygotes. L'IFN α favorise la division des CSH par autorenouveaulement des CSH CALR^{del52}. Au contraire l'IFN α favorise la division des CSH par différenciation des CSH JAK2^{V617F} et CALR^{ins5} avec un ciblage plus important des CSH JAK2^{V617F} homozygotes.



MYELOID NEOPLASIA

Inferring the dynamics of mutated hematopoietic stem and progenitor cells induced by IFN α in myeloproliferative neoplasms

Matthieu Mosca,^{1,4,*} Gurvan Hermange,^{5,*} Amandine Tisserand,^{1,2,4,6,*} Robert Noble,^{7-10,*} Christophe Marzac,^{1-3,11} Caroline Marty,¹⁻⁴ Cécile Le Sueur,⁷ Hugo Campario,¹² Gaëlle Vertenoil,¹³ Mira El-Khoury,^{1,2,4} Cyril Catelain,¹⁴ Philippe Rameau,¹⁴ Cyril Gella,¹¹ Julien Lenglet,¹⁵ Nicole Casadevall,^{1,16} Rémi Favier,¹⁷ Eric Solary,^{1,2,18,19} Bruno Cassinat,^{20,21} Jean-Jacques Kiladjian,^{20,22} Stefan N. Constantinescu,¹³ Florence Pasquier,^{1-3,18} Michael E. Hochberg,^{8,23} Hana Raslova,¹⁻³ Jean-Luc Villeval,¹⁻³ François Girodon,^{12,24} William Vainchenker,^{1-4,25} Paul-Henry Cournède,⁵ and Isabelle Plo¹⁻⁴

¹INSERM, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France; ²Gustave Roussy, Villejuif, France; ³Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France; ⁴Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France; ⁵Université Paris-Saclay, CentraleSupélec, Laboratory MICS (Laboratory of Applied Mathematics and Computer Science), Gif-sur-Yvette, France; ⁶Université de Paris, Paris, France; ⁷Department of Biosciences and Engineering, ETH Zurich, Basel, Switzerland; ⁸Institut des Sciences de l'Evolution, University of Montpellier, Montpellier, France; ⁹Institute of Evolutionary Biology and Environmental Studies (IEU), University of Zurich, Zurich, Switzerland; ¹⁰University of London, London, United Kingdom; ¹¹Laboratoire d'Immuno-Hématologie, Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹²Laboratoire d'Hématologie, CHU Dijon, Dijon, France; ¹³Ludwig Institute for Cancer Research and Université Catholique de Louvain, de Duve Institute, Brussels, Belgium; ¹⁴UMS AMMICA–Plateforme Imagerie et Cytométries, Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹⁵Hôpital Privé d'Antony, Antony, France; ¹⁶Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint-Antoine, Paris, France; ¹⁷Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service d'Hématologie Biologique, Hôpital d'Enfants Armand-Trousseau, Paris, France; ¹⁸Département d'Hématologie, Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹⁹Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²⁰Université de Paris, INSERM UMR-S 1131, Institut de Recherche Saint-Louis (IRSL), Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ²¹Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Laboratoire de Biologie Cellulaire; ²²Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Centre d'Investigations Cliniques, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; ²³Santa Fe Institute, Santa Fe, NM; ²⁴INSERM, UMR 866, Centre de Recherche, Dijon, France; and ²⁵Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Service d'Immunopathologie Clinique, Polyclinique d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

KEY POINTS

- IFN α targets homozygous *JAK2*^{V617F} HSPCs more efficiently than heterozygous *JAK2*^{V617F} HSPCs.
- Heterozygous *JAK2*^{V617F} HSPCs are more rapidly depleted by high doses than low doses of IFN α .

Classical *BCR-ABL*-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal disorders of hematopoietic stem cells (HSCs) caused mainly by recurrent mutations in genes encoding *JAK2* (*JAK2*), calreticulin (*CALR*), or the thrombopoietin receptor (*MPL*). Interferon α (IFN α) has demonstrated some efficacy in inducing molecular remission in MPNs. To determine factors that influence molecular response rate, we evaluated the long-term molecular efficacy of IFN α in patients with MPN by monitoring the fate of cells carrying driver mutations in a prospective observational and longitudinal study of 48 patients over more than 5 years. We measured the clonal architecture of early and late hematopoietic progenitors (84 845 measurements) and the global variant allele frequency in mature cells (409 measurements) several times per year. Using mathematical modeling and hierarchical Bayesian inference, we further inferred the dynamics of IFN α -targeted mutated HSCs. Our data

support the hypothesis that IFN α targets *JAK2*^{V617F} HSCs by inducing their exit from quiescence and differentiation into progenitors. Our observations indicate that treatment efficacy is higher in homozygous than heterozygous *JAK2*^{V617F} HSCs and increases with high IFN α dose in heterozygous *JAK2*^{V617F} HSCs. We also found that the molecular responses of *CALR*^m HSCs to IFN α were heterogeneous, varying between type 1 and type 2 *CALR*^m, and a high dose of IFN α correlates with worse outcomes. Our work indicates that the long-term molecular efficacy of IFN α implies an HSC exhaustion mechanism and depends on both the driver mutation type and IFN α dose.

Introduction

Classical *BCR-ABL*-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs), including polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF), are clonal hematologic malignancies in which 1 or several mature blood cell types are overproduced. These diseases favor thrombohemorrhagic events and may transform into secondary acute myeloid leukemia. MPN occurrence is mostly associated with gain-of-function

somatic mutations in genes encoding *JAK2* (*JAK2*^{V617F}), calreticulin (*CALR*^m; type 1 *CALR*^{del52} and type 2 *CALR*^{ins53}), or the thrombopoietin receptor (*MPL*^m) that occur in hematopoietic stem cells (HSCs).¹⁻⁴ Several additional somatic mutations involved in epigenetic regulation, splicing, and transcription factors can modify disease phenotype.⁵

Interferon α (IFN α), especially pegylated IFN α (eg, Peg-IFN α 2a), induces hematologic responses in ET, PV, and some early

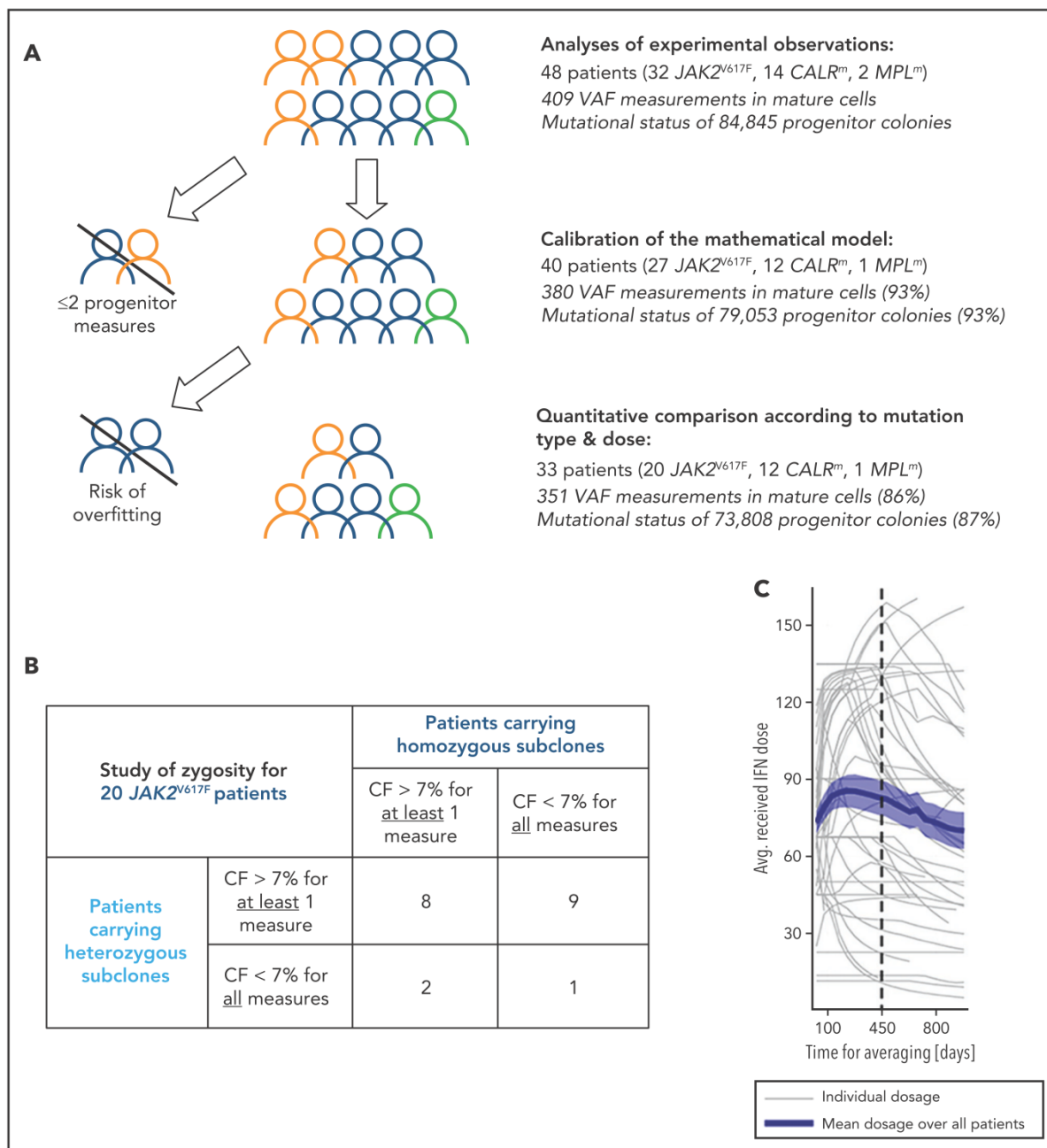


Figure 1. Inclusion criteria for various steps of analyses and IFN α dose. (A) Strategy of analysis and inclusion. Experimental observations were analyzed from progenitor and mature cells of the 48 patients of the cohort. We then excluded patients who had <2 data points (in progenitors and after the start of the therapy) for mathematical model calibration because there is no rationale to try to fit only 2 data points. To rigorously statistically analyze how IFN α doses differently impact molecular response according to the mutation type and zygosity in HSCs, we still had to exclude patients with no more than 5 progenitor type measurements from the start of the therapy for $JAK2^{V617F}$ patients. No $CALR^m$ patient was excluded because the model was less complex. The number in parentheses corresponds to the percentage of data used for the analyses. (B) To study the effect of IFN α on HSCs depending on the zygosity, it was necessary to exclude $JAK2^{V617F}$ patients whose clones exhibited too low CF over time. This analysis was not performed for $CALR^m$ MPN because only 2 of 12 patients had homozygous mutated cells. For our statistical analyses, a $JAK2^{V617F}$ patient was labeled as carrying homozygous (respectively heterozygous) subclones when CF >7% of homozygous (respectively heterozygous) progenitors were identified from ≥ 1 of the collected samples. Following this definition, some patients (8) could be considered carrying both heterozygous and homozygous subclones. Using this criterium, 17 patients carry heterozygous subclones and 10 patients carry homozygous subclones. (C) Averaged IFN α dose received over time by the 48 patients. Gray lines, individual dosage; blue line, mean dose received by the 48 patients; shaded areas surrounding the curve, standard error of the mean.

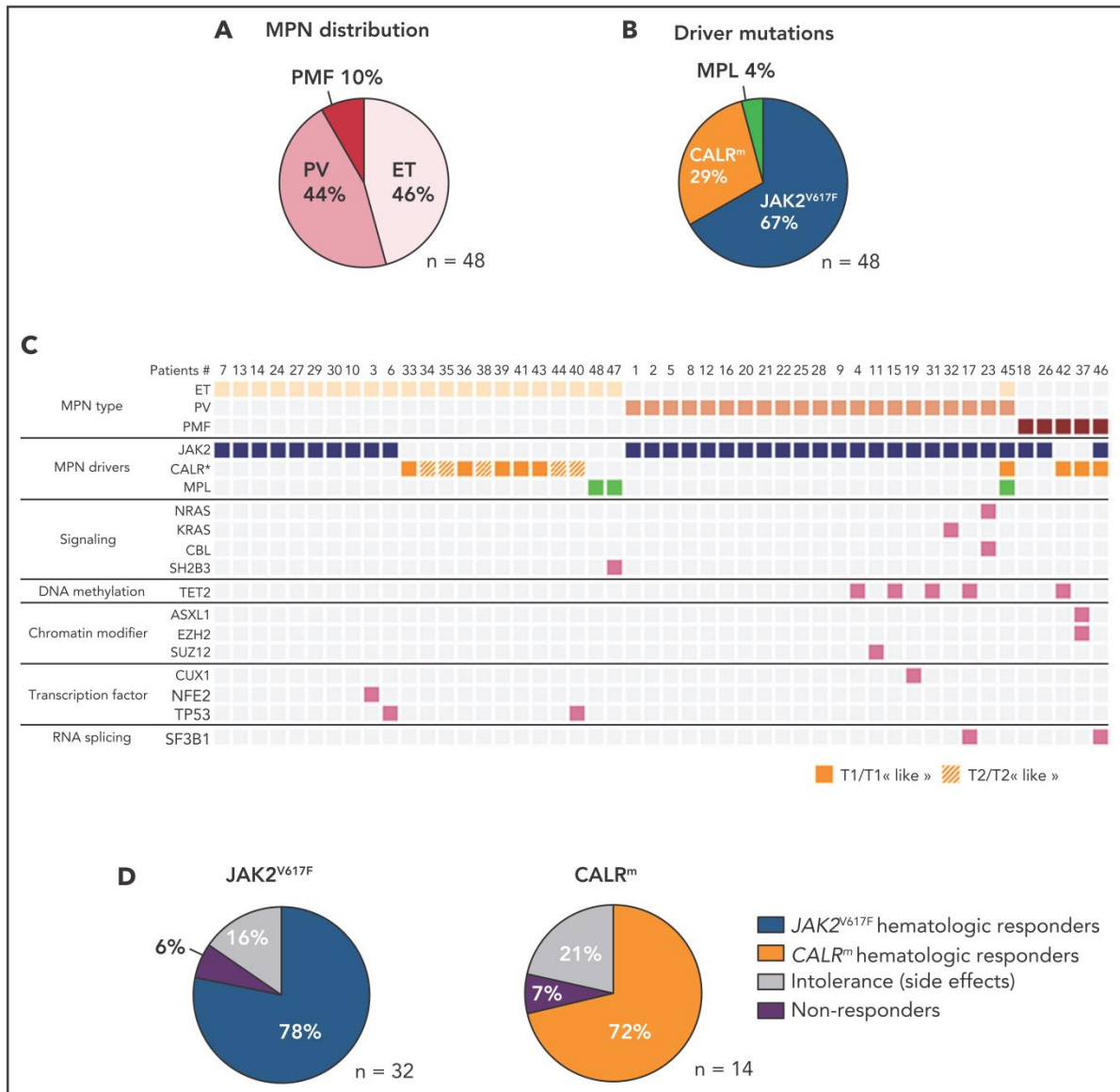


Figure 2. Characterization of the IFN α -treated MPN patient cohort. (A) Distribution of MPN diseases. (B) Distribution of MPN driver mutations. (C) Diseases and the molecular profile determined using an NGS myeloid panel of 77 genes of the first sample collected from the 48 patients in the studied cohort. P45 presented 2 diseases, ET/PV, based on its molecular profile ($JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$) and its high platelets count and hematocrit (75%) (D) Percent of hematologic response, non-response, or intolerance among patients with $JAK2^{V617F}$ or $CALR^m$ MPNs.

PMF,⁶⁻¹⁰ as recently evidenced in a phase 2 clinical trial performed in hydroxyurea (HU)-refractory/intolerant patients with $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ MPNs.¹¹ Phase 3 randomized clinical trials demonstrated that another pegylated IFN, Ropeg-IFN α 2b, increased the hematologic response rate compared with HU¹² or to phlebotomy¹³ in patients with PV. Importantly, IFN α , contrary to cytoreductive therapies or JAK inhibitors, can decrease the $JAK2^{V617F}$ variant allele frequency (VAF) in blood cells of approximately 60% of patients, including complete molecular responses in 20% of cases,^{6,11,12} whereas its impact on $CALR^m$ VAF is more debated.^{11,14-16}

However, it remains unknown which factors impact the IFN α -induced long-term molecular response rate. To unravel these determinants, we performed a prospective longitudinal analysis of the long-term dynamics of $JAK2^{V617F}$, $CALR^m$, and MPL^m in hematopoietic stem and progenitor cells (HSPCs) of patients with MPN treated with IFN α . Over 5 years, we collected a rich dataset from 48 patients with early and late progenitors together with the VAF in mature cells. Results from these investigations have permitted us to: (1) investigate how IFN α targets HSPCs differently according to mutation type, zygosity, and dose and (2) build a mathematical model linked to a hierarchical

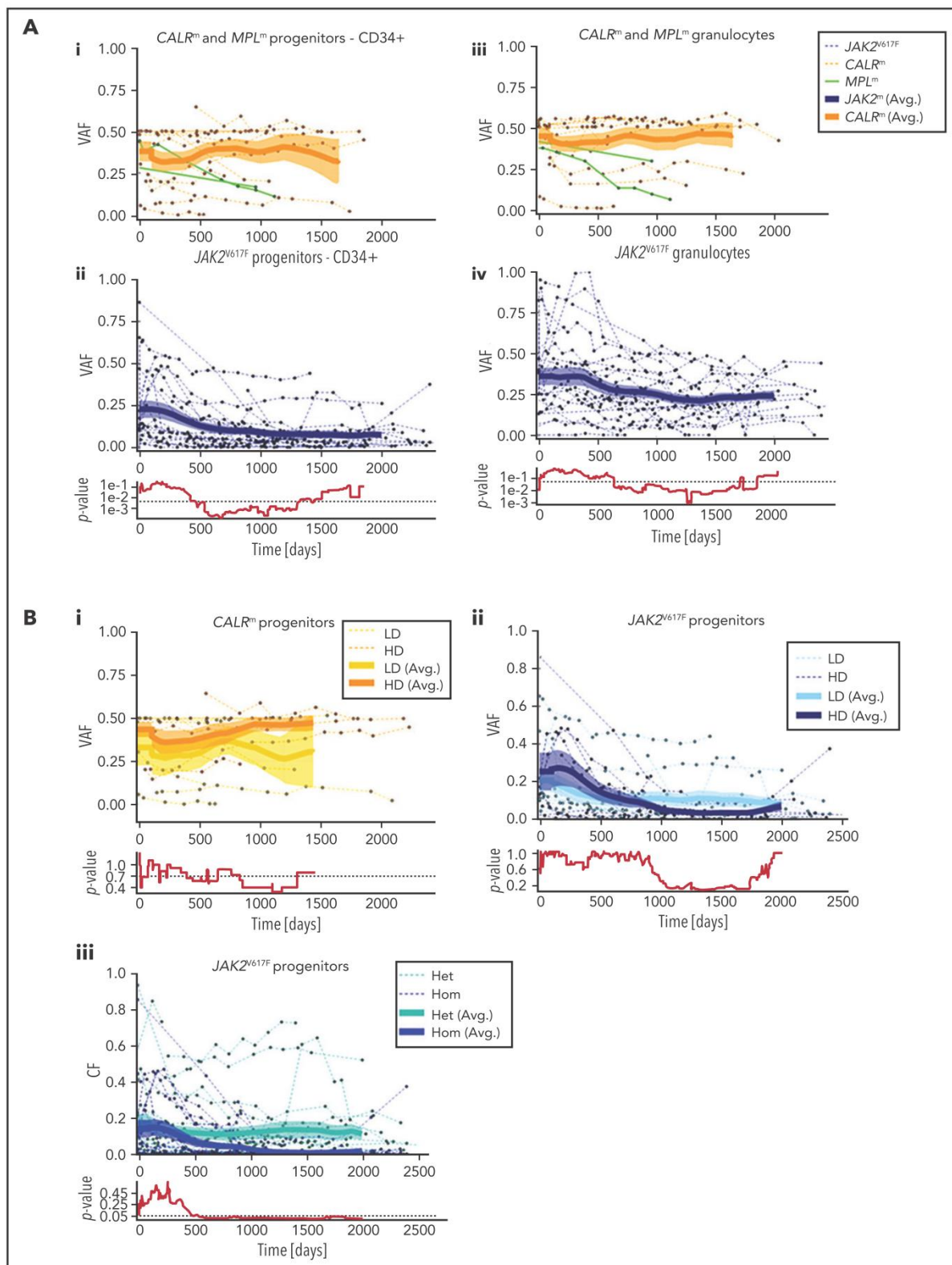


Figure 3. Hematopoietic progenitors are targeted differently according to the driver mutation type or zygosity and the IFN α dose. (A) Effect of IFN α in different hematopoietic compartments during the clinical survey of the 48 patients. Graph lines indicate the VAF calculated in CD34⁺ progenitors (i-ii) and measured in granulocytes (iii-iv) for CALR^m and MPL^m patients (i-iii) and JAK2^{V617F} patients (ii-iv). Thin lines, data from each patient harboring JAK2^{V617F} (dotted blue), CALR^m

Bayesian inference method that allows us to infer the dynamics of mutated HSCs and their response to IFN α therapy.

Materials and methods

Patients, cell purification, and progenitor cultures

Peripheral blood samples and bone marrow were collected from patients with their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the Ethics Committee from Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Dijon, Saint Louis Hospital, and Gustave Roussy; from Comité de Protection des Personnes Ile de France IV Institutional Review Board (IRB) (agreement from US Department of Health and Human Services IRB 00003835-protocol 2015/59-NICB) and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (authorization 915663).

Mononuclear cells and granulocytes were purified by a Ficoll density gradient. Granulocytes were isolated, and CD34⁺ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS; Miltenyi Biotec). CD34⁺ cells were labeled with anti-CD90, -CD34, and -CD38 antibodies (Becton Dickinson), and CD90⁺CD34⁺CD38⁻, CD90⁻CD34⁺CD38⁻, and CD90⁻CD34⁺CD38⁺ cell fractions were sorted at 1 progenitor per well in 96-well plates with a BD Influx cell sorter. Clones were expanded in serum-free medium with a cocktail of human recombinant cytokines containing 1 U/mL erythropoietin (Amgen), 20 ng/mL thrombopoietin (generous gift from Kirin), 10 ng/mL Fms-related tyrosine kinase 3- ligand (Celldex Therapeutics), 10 ng/mL interleukin-3, 20 ng/mL granulocyte colony-stimulating factor, 10 ng/mL interleukin-6 (Miltenyi Biotec), 25 ng/mL stem cell factor, and 5 μ g/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (Peprotech). Fourteen days later, individual colonies corresponding to the progeny of each progenitor were lysed, and DNA was genotyped for homozygous, heterozygous or wild-type (WT) status as previously described.^{1,15,17,18}

Inclusion, response criteria, and IFN α doses

This prospective, longitudinal, and observational study included 48 patients with ET, PV, or PMF diagnosis according to the 2016 iteration of the World Health Organization classification¹⁹ with JAK2^{V617F}, CALR^m, or MPL^m. These patients were included and followed for ≥ 3 months after starting Peg-IFN α therapy. Hematologic response was assessed according to the European LeukemiaNet criteria for ET and PV. Prior treatments with other cytoreductive drugs were not excluded.

As indicated in Figure 1A, we first determined the effect of genotype and dose in progenitor and mature cells for the 48 patients. Second, to evaluate the IFN α -induced dynamics of

mutated HSCs, we used a mathematical model. Several inclusion criteria were used for the parameter estimation of the mathematical model and the statistical analyses. In our population-based hierarchical framework, even patients with few data points bring information to estimate the population parameters. Thus, to calibrate the model, we included 40 patients for which we have at least 3 data time points. However, the estimation of individual parameters for patients with few data points suffers from overfitting. Therefore, to conduct hypothesis testing between subpopulations (mutation type, dose) that relies on individual parameters, we excluded patients with fewer than 5 progenitor measurements for JAK2^{V617F} (mainly corresponding to intolerant patients). No further CALR^m patient was excluded because the model was less complex. Moreover, patients may carry heterozygous and/or homozygous subclones in different proportions. When we analyzed the impact of the zygosity on the response to IFN α and thus studied separately the homozygous and heterozygous subclones, as permitted by our model, it was necessary to exclude the data of patients whose subclones exhibited low clonal fraction (CF; <7%). In our cohort, most CALR^m patients carried only heterozygous mutated subclones (10 of 12 cases). For JAK2^{V617F} patients, we defined 2 overlapped subgroups: patients carrying sufficient proportion of heterozygous subclones (17 patients) or homozygous subclones (10 patients) with several patients harboring both (Figure 1B).

Patients received variable Peg-IFN α doses over their follow-up (ie, doses were commonly increased within the first months of therapy and then decreased after about 450 days; Figure 1C). Peg-IFN α doses used throughout the article are averages computed over the first 450 days of therapy (supplemental Table 1 available on the Blood Web site). To test the dose effect on the response, we divided patients into high- (HD) and low-dose (LD) groups according to whether the average dose was above or below the median and performed Mann-Whitney *U* tests. To complement our analyses and avoid this binary distinction between HD and LD, we also considered the dose as a continuous quantity, performed linear regressions (response factor against dose), and tested the nullity of the linear regression coefficients.

Mathematical model

We extended the model of Michor et al²⁰ to infer the latent dynamics of the mutated stem cells targeted by IFN α . Numbers of WT quiescent HSCs, active HSCs, progenitors, and mature cells are, respectively, denoted as N_1 , N_2 , N_i , and N_m . The corresponding mutated cell numbers are denoted $N_{het,1}$, $N_{het,2}$, $N_{het,i}$, and $N_{het,m}$ for heterozygous mutated cells and $N_{hom,1}$, $N_{hom,2}$, $N_{hom,i}$, and $N_{hom,m}$ for homozygous mutated cells. HSCs become active at rate α and quiescent at rate β . These parameters are indexed with subscripts to distinguish WT,

Figure 3 (continued) (dotted orange), or MPL^m (green); thick curves, smoothed averages (floating averages ± 100 days) from the 32 JAK2^{V617F} (blue) or 14 CALR^m (orange) patient data; surrounding shaded areas, standard error of the mean. *P* values were calculated between CALR^m and JAK2^{V617F} data. Within the first 300 days, there was no significant difference between CALR^m and JAK2^{V617F} patient VAF. Significant differences between CALR^m and JAK2^{V617F} cases were observed starting from 600 days of treatment in the progenitor compartment using a Mann-Whitney *U* test ($P < .0005$). Less difference between CALR^m and JAK2^{V617F} VAF was observed in mature cells ($P < .025$ after 650 days). (B) Effect of IFN α according to driver mutation type or zygosity and the IFN α dose during the clinical survey. The VAF were computed by pooling the data from each of the 3 progenitor compartments for (i) patients with CALR^m MPN treated with IFN α at high doses (HD, >78 μ g/wk on average) or low doses (LD, <78 μ g/wk); (ii) patients with JAK2^{V617F} MPN treated with IFN α at HD (>96.5 μ g/wk) or LD (<96.5 μ g/wk); and (iii) JAK2^{V617F} heterozygous or homozygous progenitors independently of the doses. Thin line, data from a single patient; thick curves, smoothed averages (floating averages ± 100 days) from the JAK2^{V617F} (blue) or CALR^m (orange) patient data; shaded areas surrounding the curve, standard error of the mean. Differences were calculated between heterozygous and homozygous JAK2^{V617F} progenitors after 600 days of treatment (Mann-Whitney *U* test, $P < .03$) and were significant after 1000 days of treatment (Mann-Whitney *U* test, $P < .003$).

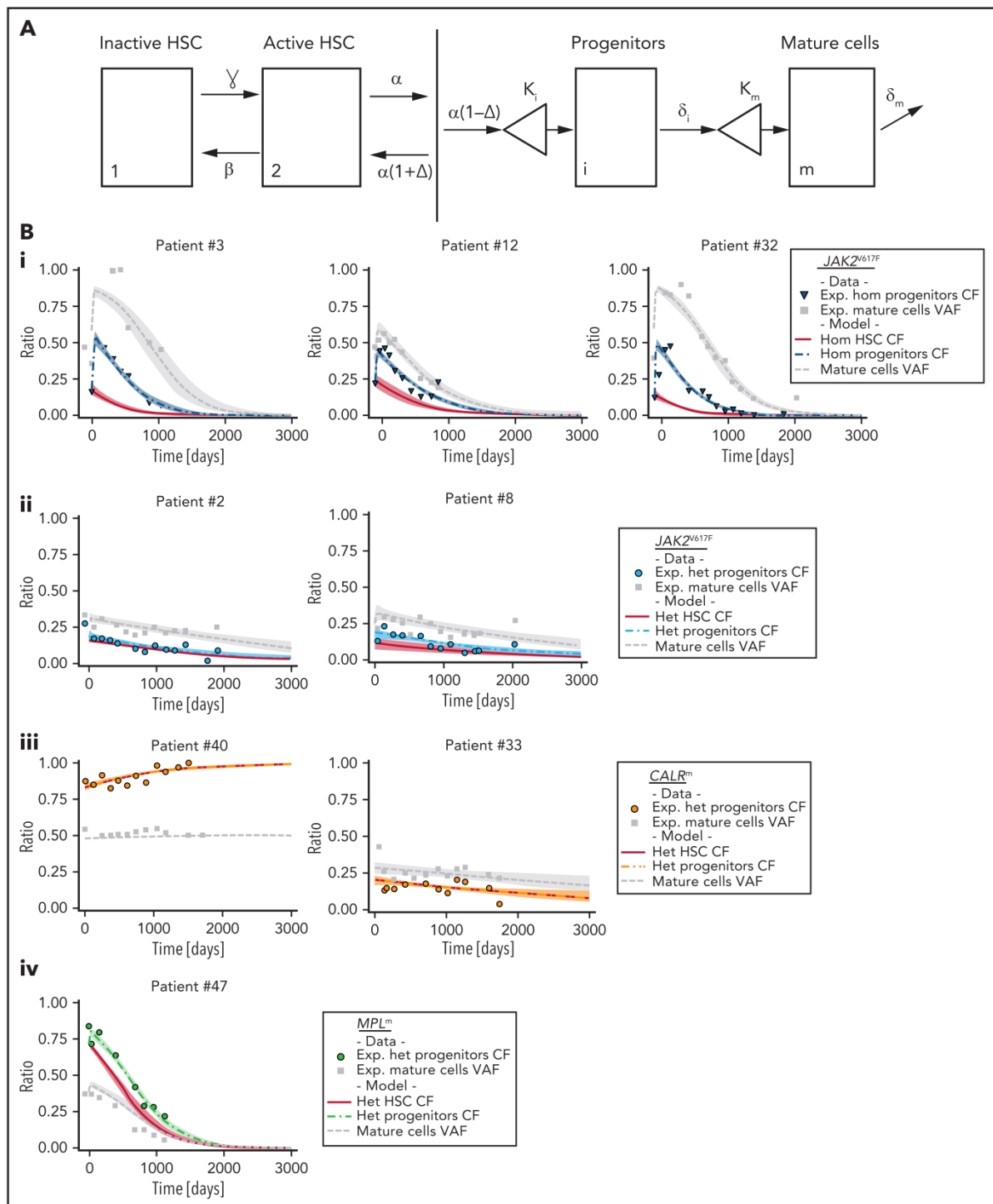


Figure 4. Mathematical model and inferred dynamics of $JAK2^{V617F}$, $CALR^m$, and MPL^m cells. (A) Design of the mathematical model. Mature and fully differentiated cells no longer divide and die at a rate δ_m . We modeled progenitor cells as originating from active HSCs that divide and encounter several divisions (modeled by the parameter κ_i). Progenitors exit their compartment at the differentiation rate δ_i and proliferate (modeled by the parameter κ_m) before entering the mature compartment. We also introduced 2 stem cell compartments depending on whether the HSC is considered active or inactive (quiescent), parameters α and β model the exchanges between these 2 compartments. We assumed that the active HSCs might be recruited to differentiate at a rate α to contribute to hematopoiesis. Parameter Δ models the propensity of the stem cell pool to be depleted (if $\Delta < 0$) or to expand (if $\Delta > 0$). (B) Examples of dynamics of inferred progenitor, HSC (CF), and mutated mature cells (VAF) are presented. Dynamics focusing on (i) homozygous $JAK2^{V617F}$ cells for 3 patients, (ii) heterozygous $JAK2^{V617F}$ cells from 2 patients, (iii) heterozygous

heterozygous, or homozygous cells. Active HSCs can be recruited for contributing to hematopoiesis with rate α , and parameter Δ models the propensity of the stem pool to deplete (if $\Delta < 0$) or to expand (if $\Delta > 0$). Homeostatic conditions are achieved by setting $\Delta = 0$. Progenitors originate from a stem cell that has undergone several divisions, modeled by clonal expansion parameter κ_i . Progenitors exit their compartment at rate δ_i . Having undergone further clonal expansion (modeled by κ_m), progenitors become mature cells that die at rate δ_m . The basic mathematical model is given as follows:

$$\begin{cases} \dot{N}_1 = -\gamma N_1 + \beta N_2 \\ \dot{N}_2 = \gamma N_1 + (\alpha\Delta - \beta)N_2 \\ \dot{N}_i = \alpha(1 - \Delta)\kappa_i N_2 - \delta_i N_i \\ \dot{N}_m = \delta_i \kappa_m N_i - \delta_m N_m \end{cases}$$

From the absolute numbers of cells, we obtain corresponding clonal fractions by normalization. We assume that IFN α modifies some parameter values after the start of the therapy. These modified parameters are marked with an asterisk.

Statistical inference method

We distinguish 3 populations of patients based on their disease mutation ($JAK2^{V617F}$, $CALR^m$, or MPL^m). Within each population, we estimate patient-specific parameters using a Bayesian hierarchical framework. This population-based approach adds robustness to the results and reduces overfitting. We provide more details about the inference models and their validation in the supplemental Methods.

Results

Study of MPN prospective cohort treated with IFN α

In a prospective observational study performed over 5 years, we included 48 patients with MPN and analyzed their blood samples either before and during IFN α treatment or only during treatment (supplemental Table 1). This cohort includes 21 PV (44%), 22 ET (46%), and 5 PMF (10%). We detected 32 patients with MPN with $JAK2^{V617F}$, 12 with $CALR^m$ (7 type 1 and 5 type 2), 2 with $MPL^{W515K/R}$, 1 having both $JAK2^{V617F}$ and $CALR^{del46}$, and 1 having $JAK2^{V617F}$, $CALR^{del52}$, and MPL^{S505N} (Figure 2A-B). We classified the last 2 cases as $CALR^m$ MPN because the $CALR^m$ VAF > 0.4 was clearly dominant²¹ and because the $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ were mutually exclusive in progenitors (supplemental Figure 1). Next-generation sequencing (NGS) of a myeloid-focused panel of 77 genes using genomic DNA isolated from granulocytes identified additional mutations in 31% of these cases (Figure 2C). The median age before treatment was 53 years (range, 25-71 years). The median dose was 71 $\mu\text{g}/\text{wk}$ (range, 11-157 $\mu\text{g}/\text{wk}$). Hematologic response was observed in 78% of $JAK2^{V617F}$, 72% of $CALR^m$, and in the 2 MPL^m cases. Side effects leading to treatment discontinuation were observed in 16% and 21% of patients having $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ MPN, respectively. We found 6% to 7% hematologic nonresponders in both $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ cases (Figure 2D).

IFN α targets hematopoietic progenitors differently according to mutation type, zygosity, and dose

Samples were collected longitudinally several times per year, and 5 different cell populations were purified from the peripheral blood for each time point. These cell populations included mature cells (granulocytes and platelets) and different types of progenitors including HSC-enriched progenitors ($CD90^+CD34^+CD38^-$), immature progenitors ($CD90^-CD34^+CD38^-$), and committed progenitors ($CD90^-CD34^+CD38^+$). On the one hand, we performed the global allele burden in granulocytes (409 measures), in platelets (102 measures), and in $CD34^+$ progenitors (175 measures). We observed that, at a given time point, the $JAK2^{V617F}$ VAF correlated in platelets and granulocytes and was similar among all progenitor types (supplemental Figure 2). On the other hand, we performed single-cell colony assay using progenitors for 395 time points. The median number of genotyped progenitor-derived colonies was 226 per time point, and the median clonogenicities were 67%, 71%, and 79% for $CD90^+CD34^+CD38^-$, $CD90^-CD34^+CD38^-$, and $CD90^-CD34^+CD38^+$, respectively. Altogether, we analyzed the genotypes of 84 845 progenitor-derived colonies for the whole cohort (supplemental Figure 3A-D). We observed a significant correlation between the VAF measured from the genotype of progenitor-derived colonies and from the $CD34^+$ progenitor bulk (supplemental Figure 2). For 2 patients, we observed a very close $JAK2^{V617F}$ VAF in progenitors and in granulocytes both in the bone marrow and peripheral blood at a given time point (supplemental Figure 3E).

Using the VAF from the experimental data in granulocytes and progenitors, we monitored the dynamics of $JAK2^{V617F}$, $CALR^m$, and MPL^m cells during IFN α treatment in the 48 patients. Although $CALR^m$ VAF remained stable during treatment, the $JAK2^{V617F}$ VAF decreased over time in both mature hematopoietic cells and progenitors. $CALR^m$ and $JAK2^{V617F}$ VAF became substantially different after 600 days of treatment. The 2 MPL^m cases demonstrated a clear molecular response over time (Figure 3; supplemental Figure 4).

We investigated whether the dynamics of $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ progenitors vary with different IFN α doses. Although we did not detect any significant effect of IFN α dose on $CALR^m$ progenitors (Figure 3Bi), $JAK2^{V617F}$ VAF decreased in progenitors with a better response on detected from day 1000 (Figure 3Bii). Typically, in some individuals with $JAK2^{V617F}$ MPN treated with high IFN α doses, we observed an increase in the $JAK2^{V617F}$ VAF at the beginning of treatment followed by a substantial decrease and spikes in total numbers of progenitor cells, granulocytes, and platelets (bell curves; supplemental Figure 4). In contrast, a progressive and continuous VAF decrease was seen in patients treated with IFN α LD. Finally, progenitors carrying homozygous $JAK2^{V617F}$ were significantly more sensitive to IFN α than those carrying heterozygous $JAK2^{V617F}$ starting from 600 days of treatment (Figure 3Biii).

Figure 4 (continued) $CALR^m$ cells from 2 patients, and (iv) heterozygous MPL^m cells from a patient. Dots, square, and triangles, experimental data values; curves, median values determined from the mathematical model; red line, inferred dynamics of mutated HSCs (overlaid with the heterozygous progenitor CF for $CALR^m$ cases); shaded areas surrounding each curve, 95% confidence intervals. When comparing mature cells dynamics to heterozygous progenitor dynamics, we must keep in mind that the VAF in progenitor cells would be half the CF.

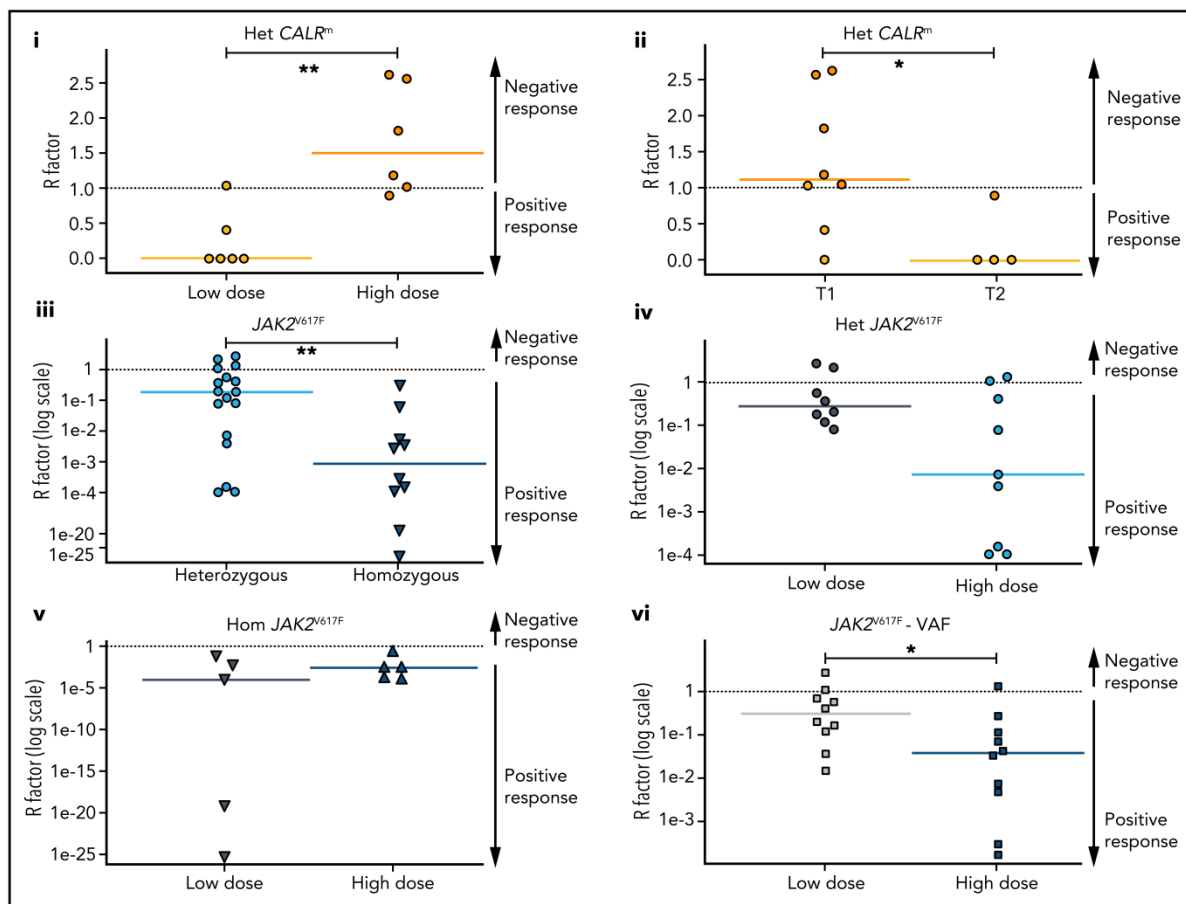


Figure 5. HSC are targeted differently according to driver mutation type and zygosity and the IFN α doses. Molecular stem cell response factor (R factor) was predicted at the end of the survey (3000 days) for (i) heterozygous $CALR^m$ HSCs in patients treated with high vs low IFN α doses, (ii) heterozygous type 1 vs heterozygous type 2 $CALR^m$ HSCs, (iii) heterozygous vs homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs, (iv) heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs in patients treated with high vs low IFN α doses, (v) homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs in patients treated with high vs low IFN α doses, and (vi) global $JAK2^{V617F}$ - VAF in HSCs in patients treated with high vs low IFN α doses. The R factor is defined as the ratio (median value) between the inferred mutated HSC proportion after a given time of treatment ($t = 3000$ days) over the proportion of mutated HSCs at the initial time. Depending on the context, it refers to heterozygous or homozygous CF or VAF. Dash lines, $R = 1$ for no response, $R > 1$ for a negative response, and $R < 1$ for a positive response. $R < 0.5$ corresponds to a PMR, and $R \sim 0$ corresponds to a complete molecular response. Solid lines, R median. R significantly differs between heterozygous $CALR^m$ HSC with low vs high IFN α doses (Mann-Whitney U test, $P = .0087$) and between type 1 $CALR^m$ and type 2 $CALR^m$ (Mann-Whitney U test, $P = .0162$). R significantly differs between heterozygous and homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs (Mann-Whitney U test, $P = .0047$). R tends to differ between heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs treated with high vs low IFN α doses (Mann-Whitney U test, $P = .0745$). R significantly differs in the global $JAK2^{V617F}$ - VAF in HSC between treatment with high and low doses of IFN α (Mann-Whitney U test, $P = .0288$). For each patient, we computed an average of received IFN α doses over the first 450 days of treatment. HD vs LD are defined according to the median dose of the groups of considered patients. The threshold is automatically computed to compare 2 subgroups of patients of the same size. The dose thresholds of IFN α are 78 $\mu\text{g}/\text{wk}$ for heterozygous $CALR^m$ HSCs, 96.5 $\mu\text{g}/\text{wk}$ for $JAK2^{V617F}$ HSCs, 96 $\mu\text{g}/\text{wk}$ for heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs, and 108 $\mu\text{g}/\text{wk}$ for homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs. Statistical differences were calculated using a Mann-Whitney U test: * $P < .05$, ** $P < .01$.

In aggregate, these results identify a slow clearing of $JAK2^{V617F}$ progenitors over time in IFN α -treated patients, whereas $CALR^m$ progenitors are less responsive on average. Moreover, IFN α targets $JAK2^{V617F}$ progenitors faster at HD and is more efficient against homozygous than heterozygous cells.

Inferring IFN α -induced dynamics of mutated HSCs using mathematical and statistical modeling

Potential weaknesses in the analysis of experimental data are a lack of pretreatment evaluation in several patients and the heterogeneity within the most purified HSC fraction (here $CD34^+CD38^-CD90^+$). To precisely characterize IFN α -induced dynamics of mutated HSCs, progenitors, and mature cells and

to infer long-term treatment effects on mutated HSCs, we designed a compartmental mathematical model²⁰ (Figure 4A). This model was used as a rigorous mathematical framework to leverage information from our data. It is based on the hypothesis that IFN α induces latent and unobserved HSC dynamics that impact progenitor cells and granulocytes.²² Cell populations were divided into compartments according to genotype and maturity: inactive HSCs (compartment 1) or active HSCs (compartment 2) that can generate differentiated progenitors (compartment i) that in turn will give rise to mature cells (compartment m). This type of model with 2 HSC compartments could explain the bell curves observed on IFN α treatment in several $JAK2^{V617F}$ patients. The model potentially includes many

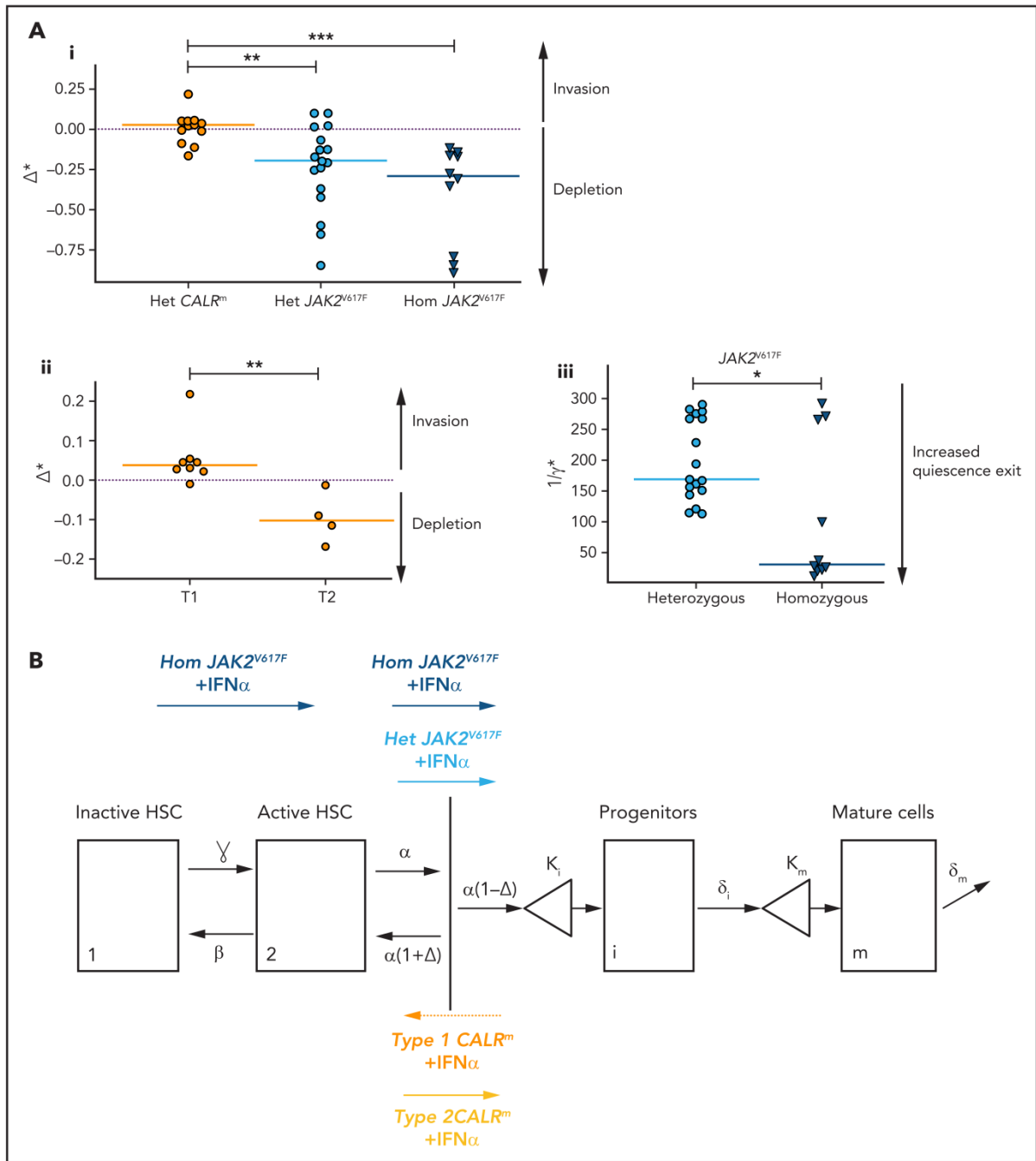


Figure 6. IFN α differentially impacts on $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ HSC homeostasis. (A) Graphs indicate the means values (solid lines) of the estimated parameters calculated using the mathematic model. (i) Δ^* parameters were calculated in heterozygous and homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs and heterozygous $CALR^m$ HSCs. Δ^*_{het} significantly differs in patients with $CALR^m$ MPN vs those having $JAK2^{V617F}$ MPN (Mann-Whitney U test, $P = .0031$). Δ^*_{het} in patients with $CALR^m$ MPN is significantly different from Δ^*_{hom} of those having $JAK2^{V617F}$ MPN (Mann-Whitney U test, $P < .0001$). The dotted lines indicate $\Delta^* = 0$. $\Delta^* > 0$ corresponds to an expansion, and $\Delta^* < 0$ corresponds to a depletion of the stem compartment. (ii) Δ^*_{het} parameters were calculated in type 1 and type 2 $CALR^m$ HSCs. Δ^*_{het} significantly differs in patients with type 1 $CALR^m$ MPN vs those with type 2 $CALR^m$ MPN (Mann-Whitney U test, $P = .004$). (iii) Inverse ratios of the γ^* parameter was calculated in heterozygous vs homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs. The $1/\gamma^*$ value can be seen as a relative time spent by cells in the inactive compartment of our model. The $1/\gamma^*$ significantly differs in heterozygous vs homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs (Mann-Whitney U test, $P = .027$). (B) Proposed mechanism of IFN α in $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ HSCs.

patient-specific parameters that can lead to risks of overfitting and nonidentifiability. Because it is particularly challenging to infer the parameter values of human HSCs, we made several hypotheses (supplemental Table 2). Because chronic, in contrast to acute, IFN α exposure induces transient proliferation of mouse HSCs followed by a rapid return to quiescence,²³⁻²⁵ we assumed that IFN α barely influences the parameters of normal human HSCs. In addition, we simplified the model to 1 HSC compartment in *CALR^m* patients to avoid overfitting based on reports showing a high clonal advantage of mutated *CALR^m* in the HSPC compartment compared with the *JAK2^{V617F}* HSCs, suggesting that *CALR^m* HSCs are more active.^{18,26}

We calibrated the model based on the data of 27 *JAK2^{V617F}*, 12 *CALR^m*, and 1 *MPL^m* cases and chose a hierarchical Bayesian framework to increase robustness. Assuming that patients with the same driver mutation would have comparable parameter values, we considered 3 independent subpopulations (ie, 3 independent parameter distributions in the hierarchical framework; supplemental Figure 5). With relatively few degrees of freedom, our simple model can fit the longitudinal molecular data (supplemental Figure 6) and describe *JAK2^{V617F}*, *CALR^m*, and *MPL^m* progenitor and mature cell dynamics in patients for up to 3000 days of treatment (Figure 4B; supplemental Figures 7-9).

This model-based approach enabled us to infer the effects of IFN α on mutated HSCs depending on mutation type and zygosity. We inferred rapid depletion of homozygous *JAK2^{V617F}* HSCs, concomitant in some cases with an initial rapid increase followed by a drastic decrease in both the homozygous *JAK2^{V617F}* progenitor population and the *JAK2^{V617F}* granulocytes (Figure 4Bi). Among heterozygous *JAK2^{V617F}* cells, we inferred slow and simultaneous depletion of HSCs, progenitors, and granulocytes (Figure 4Bii). The dynamics of *CALR^m* cells (10 of 12 patients had no homozygous subclones) were more heterogeneous, with a slow depletion in the patients presenting a molecular response (Figure 4Biii). Finally, we deduced a rapid depletion of heterozygous *MPL^m* HSCs (Figure 4Biv).

In summary, the inferred latent HSC dynamics agree with our observations in progenitors and mature cells, and our data support our working hypothesis that IFN α is acting on mutated HSCs.

HSCs are targeted differently according to mutation type, zygosity, and IFN α doses

Most patients with *CALR^m* in our cohort have heterozygous mutated cells. Therefore, we quantified the long-term heterozygous molecular response in HSCs after 3000 days by estimating the R factor (response factor), defined as the mutated HSC proportion (or CF) relative to its initial value. We observed a heterogeneous molecular response in *CALR^m* HSCs, such that higher IFN α doses correlated with a poorer HSC response (Figure 5Ai; supplemental Figure 11i). Although few patients were analyzed, type 2 *CALR^m* HSCs were targeted more effectively than type 1 *CALR^m* HSCs (Figure 5Aii).

In contrast, we observed a molecular response in most HSCs from *JAK2^{V617F}* patients, with an R factor significantly better for homozygous than for heterozygous HSCs (Figure 5Aiii). There was an improved response of heterozygous *JAK2^{V617F}* HSCs on

treatment with HD of IFN α ($P = .0745$ with the Mann-Whitney U test; $P = .0498$ when testing the nullity of the linear regression coefficient; Figure 5Aiv), but no strong dose effect on the response of homozygous HSCs (Figure 5Av). When analyzing the global *JAK2^{V617F}* VAF, patients treated with HD of IFN α responded the best (Figure 5Avi). In addition, we observed a clear tendency for better responses while continuously increasing the doses (supplemental Figure 11ii,iv).

We next inferred the median time to achieve a 50% reduction of R factor (partial molecular response [PMR]) in mutated HSCs. Homozygous *JAK2^{V617F}* HSCs were depleted faster than heterozygous *JAK2^{V617F}* HSCs in responding patients (350 days vs 920 days, respectively; supplemental Figure 11Bi). The IFN α dose significantly reduced the PMR in heterozygous HSCs (supplemental Figure 11Bii) but not in homozygous HSCs (supplemental Figure 11Biii). In comparison, while receiving a LD of IFN α , we estimated that patients with *MPL^m* and type 2 *CALR* reached the PMR approximately at 600 days (supplemental Figure 11iv).

In patients with predominantly *JAK2^{V617F}* cells, we found no evidence that the disease type (PV or ET), patient age at treatment initiation, sex, or the presence of associated mutations influences the mutated stem cell dynamics (supplemental Table 1).

In summary, we inferred that the molecular response at the HSC level induced by IFN α is dependent on the type of mutation (*JAK2^{V617F}*, type 1/2 *CALR^m*), *JAK2^{V617F}* zygosity, and IFN α dose.

IFN α differentially impacts on *JAK2^{V617F}* and *CALR^m* HSC homeostasis

The mathematical model built to describe the dynamics of HSPCs also aims to provide insights on IFN α mechanism of action. The 2 critical parameters introduced in the model to describe IFN α effects are Δ^* and \varkappa^* : Δ^*_{het} and \varkappa^*_{het} for heterozygous cells and Δ^*_{hom} and \varkappa^*_{hom} for homozygous cells. The first parameter Δ^* indicates the self-renewal divisions of mutated HSCs under IFN α and becomes negative if divisions generate more differentiated cells, eventually leading to HSC exhaustion. The second parameter \varkappa^* describes the rate at which quiescent mutated HSCs become active. An increase of \varkappa^* means that more mutated HSCs are active and available to contribute to hematopoiesis.

In patients with *JAK2^{V617F}* MPN, we estimated that IFN α induces negative values for Δ^*_{het} and Δ^*_{hom} (-0.20 and -0.29 , respectively; Figure 6Ai; supplemental Figure 12i), indicating, according to our modeling, that IFN α would promote differentiating divisions of mutated HSCs leading to the exhaustion of that compartment. The Δ^* values were found to differ significantly between patients with *JAK2^{V617F}* MPN and those with *CALR^m* MPN, suggesting a mechanism of action of IFN α relying on *JAK2^{V617F}* HSC depletion (Figure 6Ai; supplemental Figure S12i,iii). Nevertheless, the estimated Δ^* values of type 2 *CALR^m* HSCs were significantly reduced compared with type 1 *CALR^m* HSC (Figure 6Aii). Finally, IFN α would promote more exit from quiescence of homozygous *JAK2^{V617F}* HSC compared with heterozygous *JAK2^{V617F}* HSCs, as indicated by the estimated \varkappa^* values (Figure 6Aiii; supplemental Figure 12ii).

Altogether, we inferred that IFN α leads to $JAK2^{V617F}$ and type 2 $CALR^m$ HSC depletion by decreasing their tendency to self-renew. Moreover, IFN α would increase the exit of homozygous $JAK2^{V617F}$ HSC from quiescence.

Discussion

This prospective, longitudinal analysis of patients with MPN treated with IFN α over a 5-year period generates a rich dataset that, combined with mathematical modeling and hierarchical Bayesian inference, identifies the differential molecular responses of $JAK2^{V617F}$, MPL^m , and $CALR^m$ MPNs.

As previously reported from clinics, we observed high hematologic response rates in MPN regardless of the type of disease type and driver mutation.⁶⁻¹⁰ The global molecular response in granulocytes presented a decrease in VAF for $JAK2^{V617F}$ MPN in agreement with the literature.^{6,7,11,12} Moreover, our results confirm the heterogeneity in molecular responses of $CALR^m$ MPN. Overall, $CALR^m$ MPNs are less likely than $JAK2^{V617F}$ MPN to exhibit a molecular response in mature cells.^{11,14-16,27,28} We also investigated the dynamics of HSPCs targeted by IFN α in unprecedented detail and generally observed better molecular responses in $JAK2^{V617F}$ than in $CALR^m$ progenitors. These results contrast with the enhanced hematologic response to IFN α and longer survival of $CALR^m$ than $JAK2^{V617F}$ patients in several studies,^{11,27,29} potentially because IFN α has a general deleterious effect during megakaryopoiesis, which limits thrombocytosis in a disease restricted to the megakaryocytic lineage.³⁰

The proposed mathematical model combined with statistical inference methods was proven to not only fit the experimental data for progenitors and mature cells but also infer long-term molecular responses in patients rarely sampled. It further enables us to characterize HSC dynamics that are inaccessible by direct cell isolation as the $CD90^+CD34^+CD38^-$ cell fraction remains heterogeneous and would require single cell "omics" experiments to be finely characterized. With this model, we gained insights into the molecular effects of IFN α on progenitors and disease-initiating HSCs according to the type of driver mutation and IFN α dose. We found that IFN α targets efficiently most $JAK2^{V617F}$ HSCs and preferentially homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs, in agreement with our previous data for mature cells.³¹ Although there are few patients, our results suggest that IFN α preferentially targets type 2 $CALR^m$ rather than type 1 $CALR^m$ HSCs. Moreover, HD of IFN α were more effective than LD in targeting heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs. In heterozygous $CALR^m$ HSCs, higher IFN α doses correlated with a poorer response. This correlation could be because of poor hematologic response that led to increasing the IFN α dose by the treating physicians. There is at present no evidence to support HD of IFN α treatment to achieve long-term molecular response in patients with $CALR^m$. The model will need to be improved to account more precisely for time-varying treatment schedules. Interestingly, for patients with $JAK2^{V617F}$, not the type of disease nor age nor the number of associated mutations (1, 2, or 3) at the beginning of the treatment impacted the HSC dynamics. Nevertheless, we note that our study has limited power to detect effects of mutations in *TET2*, *DNMT3A*, or *TP53*³ because very few patients in our cohort presented such mutations. Our ability to infer effects of genetic polymorphisms involved in the response to IFN α , such as *IFNL4*, is limited by their moderate effect sizes.³²

The mechanisms by which IFN α specifically targets $JAK2^{V617F}$ or $CALR^m$ cells are still largely unknown. By combining mathematical modeling and Bayesian inference, we inferred that IFN α slowly depletes homozygous and heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs with half-lives of approximately 12 and 31 months, respectively. Based on an independent cohort of similar size to ours, Pedersen et al³³ recently reported that, in responders to IFN α treatment, $JAK2^{V617F}$ VAF decreased in granulocytes with a typical half-life between 1 and 2 years. They also observed that an initial increase in mutated granulocytes preceded the fastest rates of decrease as we also observed in several patients a temporary increase in the frequency of $JAK2^{V617F}$ homozygous progenitors followed by a decrease. Thus, a VAF increase at the beginning of the treatment is not necessarily associated with a pejorative long-term molecular response. These results also fit well with a previously observed increase in progenitors in the bone marrow of patients with $JAK2^{V617F}$ shortly after IFN α treatment.³⁴ The experimental dynamics are consistent with a mathematical model in which the treatment exhausts heterozygous and homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs by promoting their exit from quiescence and differentiation into progenitors. Moreover, we inferred that IFN α depletes homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs by differentiation much more effectively than heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs. Although its effect on $CALR^m$ HSCs is weaker, IFN α depletes type 2 more than type 1 $CALR^m$ HSCs. The treatment would also preferentially favor the exit from quiescence of homozygous $JAK2^{V617F}$ HSCs. Similarly, in the $JAK2^{V617F}$ mouse model, IFN α has been shown to enhance mutated HSC proliferation and exit from quiescence, resulting in an increase in total number of progenitors.^{22,35,36} Although the main mechanism of IFN α inferred by the mathematical model is HSC exhaustion by differentiation for both $JAK2^{V617F}$ and type 2 $CALR^m$ HSCs, several other mechanisms might be considered. In contrast to our dynamic study, Tong et al³⁷ found, at 1 time point after IFN α treatment using Target-Seq, an increased quiescence in homozygous and apoptosis in heterozygous $JAK2^{V617F}$ HSPCs. It is possible that such pathways could be found in the remaining nontargeted $JAK2^{V617F}$ HSPCs at a later time point or that several mechanisms such as senescence or apoptosis might cooperate to reinforce the HSC exhaustion.^{34,35,37-39} Characterizing such additional factors will require more experimental data coupled with a more sophisticated model. It would also be essential to address the exact signaling mechanism of HSC depletion on IFN α . Reactive oxygen species increase, P53 and STAT1 overactivation, and a specific priming of IFN α signaling have been reported with $JAK2^{V617F}$ ³⁵ but not with $CALR^m$.¹⁶ In contrast, $CALR^m$ but not $JAK2^{V617F}$ is secreted and might deregulate the immune response induced by IFN α .⁴⁰ Our study also suggests that the weakest molecular responders are the type 1 $CALR^m$ HSCs, potentially because this type of mutation deregulates specific signaling pathways that lead to a stronger amplification at the HSC level compared with type 2 $CALR^m$.^{18,41}

Current administration of IFN α in clinical practice is neither standardized nor tailored to the causal mutation. Treatment strategies are guided primarily by hematologic response and tolerability. Our work indicates that the efficacy of IFN α exhausting mutated HSCs depends on the driver mutation type in HSCs. Moreover, it suggests that dose titration to maximally tolerated dose may be more likely to achieve reduction in $JAK2^{V617F}$ HSCs and therefore attain hematologic response. Therefore, the dose intensity should be ideally maintained over

treatment. Altogether, this study will open new avenues of research aiming to understand the precise differential effects of JAK2^{V617F} and CALR[™] on MPN initiating HSCs.

Acknowledgments

The authors thank Gustave Roussy (Y. Lecluse) for the cytometry platform; the patients that participated in this biological protocol; the nurses for providing the samples; all trainees that contributed to the work; and E. Leclercq and M. H. Courtier for technical assistance in CALR sizing.

This work was supported by grants from the Myeloproliferative Neoplasms (MPN) Research Foundation, Institut National du Cancer (INCA Plbio2014, INCA Plbio2018) (I.P. and J.-L.V.), Ligue Nationale Contre le Cancer (for HR, Équipe Labelisée 2019). I.P. and P.-H.C. received grants for the Prism Project, funded by the Agence Nationale de la Recherche under grant ANR-18-IBHU-0002, and for the Appel à Projets Pré-néoplasies 2021 (C21021LS) with financial support from Institut Thématique Multi-Organismes (ITMO) Cancer of Aviesan within the framework of the 2021-2030 Cancer Control Strategy, on funds administered by INSERM. Labex d'Excellence Globules Rouges (GR-Ex) (I.P. and J.-J.K.) is funded by the "Investissements d'Avenir" program. M.M. was supported by grants from la Ligue Nationale Contre le Cancer, Société Française d'Hématologie (SFH), and Gustave Roussy Foundation. M.E.-K. was supported by the SFH. A.T. was supported by a Ministère de l'Éducation Nationale de la Recherche et de la Technologie (MENRT) grant, and G.V. was supported by a Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) fellowship. R.N. acknowledges support from European Research Council (ERC) Synergy Grant 609883 and the National Institutes of Health, National Cancer Institute under award U54CA217376.

The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health. This manuscript was edited at Life Science Editors.

Authorship

Contribution: M.M. and A.T. performed experiments, analyzed data, and wrote the manuscript; G.H. and R.N. performed the mathematical model, analyzed the data, and wrote the manuscript; C. Marzac and C.G. performed NGS myeloid panel and CALR sizing; B.C. performed NGS

myeloid panel; G.V. and M.E.-K. performed experiments and analyzed data; P.R. and C.C. performed cytometry analysis; H.C., J.L., N.C., E.S., J.-J.K., F.P., F.G., and R.F. followed patients and provided samples; C.L.S. contributed to the mathematical model and analyzed the data; S.N.C., C. Marty, H.R., and J.-L.V. contributed to the research design; M.E.H. contributed to the research design of the mathematical model; W.V. followed patients, provided samples, and contributed to the research design; P.-H.C. supervised the study on the mathematical model, interpreted data, and wrote the paper; I.P. supervised the study, planned research, interpreted data, and wrote the paper; and all authors revised the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: J.-J.K. is consultant for AOP orphan. The remaining authors declare no competing financial interests.

ORCID profiles: R.N., 0000-0002-8057-4252; E.S., 0000-0002-8629-1341; B.C., 0000-0002-6514-3905; J.-J.K., 0000-0002-8121-438X; M.E.H., 0000-0002-6774-5213; H.R., 0000-0001-8846-5299; J.-L.V., 0000-0002-0562-925X; F.G., 0000-0003-3151-1068; W.V., 0000-0003-4705-202X; P.-H.C., 0000-0001-7679-6197; I.P., 0000-0002-5915-6910.

Correspondence: Isabelle Plo, UMR INSERM U1287, Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif, France; e-mail: isabelle.plo@gustaveroussy.fr.

Footnotes

Submitted 25 January 2021; accepted 15 July 2021; prepublished online on *Blood* First Edition 18 August 2021. DOI 10.1182/blood.2021010986.

*M.M., G.H., A.T., and R.N. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

There is a *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

REFERENCES

1. James C, Ugo V, Le Couédic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434(7037):1144-1148.
2. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270.
3. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013; 369(25):2391-2405.
4. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390.
5. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017; 129(6):667-679.
6. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, et al. Pegylated interferon- α -2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008;112(8):3065-3072.
7. Quintás-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshoury T, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α -2a. *Blood*. 2013;122(6):893-901.
8. Stauffer Larsen T, Iversen KF, Hansen E, et al. Long term molecular responses in a cohort of Danish patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis treated with recombinant interferon alpha. *Leuk Res*. 2013; 37(9):1041-1045.
9. Masarova L, Yin CC, Cortes JE, et al. Histomorphological responses after therapy with pegylated interferon α -2a in patients with essential thrombocythemia (ET) and polycythemia vera (PV). *Exp Hematol Oncol*. 2017;6(1):30.
10. Silver RT. Recombinant interferon-alpha for treatment of polycythemia vera. *Lancet*. 1988;2(8607):403.
11. Yacoub A, Mascarenhas J, Kosiorek H, et al. Pegylated interferon α -2a for polycythemia vera or essential thrombocythemia resistant or intolerant to hydroxyurea. *Blood*. 2019; 134(18):1498-1509.
12. Gisslinger H, Klade C, Georgiev P, et al; PROUD-PV Study Group. Roppeginterferon α -2b versus standard therapy for polycythemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. *Lancet Haematol*. 2020; 7(3):e196-e208.
13. Barbui T, Vannucchi AM, De Stefano V, et al. Roppeginterferon α -2b versus phlebotomy in low-risk patients with polycythemia vera (Low-PV study): a multicentre, randomised phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 2021; 8(3):e175-e184.
14. Verger E, Cassinat B, Chauveau A, et al. Clinical and molecular response to interferon- α therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood*. 2015;126(24):2585-2591.
15. Kjær L, Cordua S, Holmström MO, et al. Differential dynamics of CALR mutant allele burden in myeloproliferative neoplasms during interferon α treatment. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165336.

16. Czech J, Cordua S, Weinbergerova B, et al. JAK2V617F but not CALR mutations confer increased molecular responses to interferon- α via JAK1/STAT1 activation. *Leukemia*. 2019;33(4):995-1010.
17. Chaligné R, James C, Tonetti C, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. *Blood*. 2007; 110(10):3735-3743.
18. El-Khoury M, Cabagnols X, Mosca M, et al. Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene*. 2020; 39(31):5323-5337.
19. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia [correction published in *Blood*. 2016;128(3):462-463]. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405.
20. Michor F, Hughes TP, Iwasa Y, et al. Dynamics of chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 2005;435(7046):1267-1270.
21. Campario H, Mosca M, Aral B, et al. Impact of interferon on a triple positive polycythemia vera. *Leukemia*. 2020; 34(4):1210-1212.
22. Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- α in a murine model of polycythemia vera. *Blood*. 2013;121(18):3692-3702.
23. Pietras EM, Lakshminarasimhan R, Techner JM, et al. Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *J Exp Med*. 2014; 211(2):245-262.
24. Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, et al. IFN α activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature*. 2009; 458(7240):904-908.
25. Walter D, Lier A, Geiselhart A, et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature*. 2015;520(7548):549-552.
26. Nam AS, Kim KT, Chaligné R, et al. Somatic mutations and cell identity linked by Genotyping of Transcriptomes. *Nature*. 2019;571(7765):355-360.
27. Ianotto J-C, Chauveau A, Boyer-Perrard F, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: a French Intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018;103(3):438-446.
28. Cassinat B, Verger E, Kiladjian J-J. Interferon alfa therapy in CALR-mutated essential thrombocythemia. *N Engl J Med*. 2014; 371(2):188-189.
29. Silver RT, Barel AC, Lascu E, et al. The effect of initial molecular profile on response to recombinant interferon- α (rIFN α) treatment in early myelofibrosis. *Cancer*. 2017; 123(14):2680-2687.
30. Yamane A, Nakamura T, Suzuki H, et al. Interferon-alpha 2b-induced thrombocytopenia is caused by inhibition of platelet production but not proliferation and endomitosis in human megakaryocytes. *Blood*. 2008;112(3):542-550.
31. Hasan S, Cassinat B, Droin N, et al. Use of the 46/1 haplotype to model JAK2(V617F) clonal architecture in PV patients: clonal evolution and impact of IFN α treatment. *Leukemia*. 2014;28(2):460-463.
32. Jäger R, Gisslinger H, Fuchs E, et al. Germline genetic factors influence outcome of interferon alpha therapy in polycythemia vera. *Blood*. 2020.
33. Pedersen RK, Andersen M, Knudsen TA, et al. Data-driven analysis of JAK2V617F kinetics during interferon-alpha2 treatment of patients with polycythemia vera and related neoplasms. *Cancer Med*. 2020; 9(6):2039-2051.
34. King KY, Matatall KA, Shen C-C, Goodell MA, Swierczek SI, Prchal JT. Comparative long-term effects of interferon α and hydroxyurea on human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2015; 43(10):912-918.
35. Austin RJ, Straube J, Bruedigam C, et al. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm hematopoietic stem cell populations. *Leukemia*. 2020;34(4):1075-1089.
36. Rao TN, Hansen N, Stetka J, et al. JAK2-V617F and interferon- α induce megakaryocyte-biased stem cells characterized by decreased long-term functionality. *Blood*. 2021;137(16):2139-2151.
37. Tong J, Sun T, Ma S, et al. Hematopoietic stem cell heterogeneity is linked to the initiation and therapeutic response of myeloproliferative neoplasms. *Cell Stem Cell*. 2021;28(3):502-513.
38. Hasan S, Lacout C, Marty C, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood*. 2013;122(8):1464-1477.
39. Dagher T, Maslah N, Edmond V, et al. JAK2V617F myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML. *J Exp Med*. 2021; 218(2):e20201268.
40. Liu P, Zhao L, Loos F, et al. Immunosuppression by mutated calreticulin released from malignant cells. *Mol Cell*. 2020;77(4):748-760.
41. Benlabiod C, Cacemiro MDC, Nédélec A, et al. Calreticulin del52 and ins5 knock-in mice recapitulate different myeloproliferative phenotypes observed in patients with MPN. *Nat Commun*. 2020;11(1):4886.

PARTIE 2 : ÉTUDES DES MUTATIONS ASSOCIÉES AU COURS DU TRAITEMENT À L'INTERFÉRON ALPHA CHEZ LES PATIENTS

Introduction

Au cours de l'étude prospective de la cohorte de patients traités à l'IFN α (partie I), nous avons effectué au début du suivi des patients un profilage moléculaire des mutations par séquençage NGS dans les cellules matures (PNN) de tous les patients. Cela nous a permis d'identifier la présence de 1 ou plusieurs mutations associées chez certains patients. Notre modèle mathématique ne montre pas d'influence du nombre de mutations associées présentes au début du traitement sur la réponse à l'IFN α . Du fait de la taille de notre cohorte, du faible nombre de mutations associées retrouvées chez ces patients et de l'hétérogénéité de ces mutations, il n'a pas été possible de déterminer l'effet de ces mutations sur la réponse à l'IFN α . De la même façon que dans l'étude au début de traitement, le profilage moléculaire par NGS a été réitéré à la fin du suivi des patients dans le but de déterminer l'effet de l'IFN α sur ces mutations associées. Nous avons pu observer que certaines mutations disparaissent ou bien que la charge allélique diminue au cours du traitement.

Pour certains patients, on a pu observer une augmentation des mutations de TET2 et de TP53 ainsi que l'apparition de mutation de DNMT3A pour 3 patients. Afin d'aller plus loin dans l'investigation de l'effet du traitement en fonction de ces mutations associées, nous avons voulu corrélérer les dynamiques de ces mutations associées à celles des mutations motrices.

Pour cela, nous avons repris toutes les colonies de progéniteurs déjà génotypées pour les mutations motrices provenant des patients portant les mutations de TET2, DNMT3A ou TP53 que nous avons génotypées pour les mutations associées. Ceci nous a permis de reconstituer les architectures clonales des mutations motrices et associées ainsi que les dynamiques de toutes ces mutations au cours du traitement par IFN α .

Matériels et méthodes

Pour déterminer l'architecture clonale des mutations associées chez ces patients, nous avons récupéré les échantillons de progéniteurs obtenus lors du suivi de la cohorte exposée en partie 1 dans lesquels nous avons déterminé l'architecture clonale des mutations motrices à l'échelon clonal.

Pour détecter les mutations associées, nous avons utilisé la même stratégie que celle utilisée pour détecter les mutations motrices (partie I), par discrimination allélique à l'aide de sondes TaqMan spécifiques des mutations associées pour chaque patient (tableau 3).

Tableau 4 : Séquences des amorces ADN et des sondes Taqman utilisées pour chaque mutation associée

# patient	gène	site muté	nomenclature		sens (S) et anti-sens (AS) (5'-3')	Sonde Wild-type (WT) et muté (M) (5'-3')
			nucléotidique	protéique		
40	TP53	exon 5	c.427G>A	p.Val143Met	S : TCAACAAGATGTTTTGCCAACTG	WT : ACCTGCCCTGTGCA
					AS : ATGTGCTGTGACTGCTTGTAGATG	M : ACCTGCCCTATGCA
31	TET2	exon 3	c.579delT	p.His193fs	S : CAGTGGGCCTGAAAATCCA	WT : TGCTAATTACCATGACAAG
					AS : TGTAGCACCATTAGGCATTAGCA	M : TGCTAATTACCAGACAAGA
42	TET2	exon 3	c.944delC	p.Ser315fs	S : GATAATGCCAGTAACTAGCTGCAAT	WT : TAAATACCTGTTCTTTCAG
					AS : GATTTTTGTTGTTGAGTTGTTCTGGTT	M : CTAATACCTGTTCTTTCAG
47	DNMT3A	exon 11	c.1387delG	p.Glu463fs	S : CCAAAAAGCCCCGAAGA	WT : ACAGCGGAGAAGC
					AS : GCGCTCATCAATAATCTCCTTGA	M : CACAGCGAGAAGCC
26	DNMT3A	Exon 19	c.2311C>T	p.Arg771*	S : GCCATGGGCGTTAGTGACA	WT : ATCTCGGATTTTC
					AS : AGCTGGCCAACCAAGGTT	M : ACATCTCGTGATTTTC

Pour chaque patient, un certain nombre de colonies a été analysé par type de progéniteurs pour chaque point de suivi (tableau 4). Certains points de suivi ont été retirés car il y avait trop peu de colonies (< 15 colonies).

Tableau 5 : Médiane du nombre de colonies analysées par point de suivi pour chaque patient en fonction du type de progéniteurs analysés

Patient	CD34 ⁺ , CD38 ⁺ , CD90 ⁻	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD90 ⁻	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD90 ⁺
#40	114	58	32
#31	109	71	81
#42	115	83	45
#47	116	41	60
#26	115	37	43

Résultats

a. Analyse des mutations associées avant et après traitement à l'IFN α au sein de la cohorte de 48 patients

L'analyse des mutations associées a été réalisée sur l'ensemble de la cohorte composée de 48 patients. Dans cette cohorte, 2 patients ont été suivis après traitement à l'IFN α et 6 patients (12%) ont dû arrêter le traitement précocement suite à une intolérance. Au début du traitement, 31% des patients présentaient des mutations associées dans des protéines impliquées dans l'épigénétique, l'épissage, les modifications de la chromatine ainsi que des facteurs de transcription. Le profilage moléculaire a été réalisé vers la fin du suivi ou à la fin du suivi des patients après une médiane de temps de traitement de 42 mois (3 à 135 mois).

À la fin du suivi, nous n'avons pas observé de changement du nombre de patients présentant des mutations associées (29%). Cependant, nous avons observé que certaines mutations associées ne sont plus détectées à la fin du suivi pour 6 patients. De plus, la charge allélique de certaines mutations a diminué pour 3 des patients au cours du temps et a augmenté pour 5 d'entre eux. Par ailleurs, des mutations sont apparues chez 3 des patients, notamment celle de *DNMT3A*.

Pour essayer de comprendre si certaines mutations pouvaient interférer avec la réponse moléculaire à l'IFN α , nous nous sommes intéressés en particulier aux patients pour lesquels nous avons vu une augmentation de la charge allélique des mutations TET2 (patient #42 et #31) ou TP53 (patient #40) ainsi que ceux pour lesquels une mutation de *DNMT3A* est apparue (patients #47, #48 et #26) en faible proportion (<10%) (Figure 24).

Nous avons réalisé l'architecture clonale des mutations associées pour les patients #40, #42, #31, #26 et #47. L'architecture clonale du patients #48 n'a pas pu être réalisée pour des raisons techniques car la mutation se trouve dans une région d'ADN riche en répétitions GC.

b. Patient #40 : Évolution de la mutation TP53^{V143M} et CALR^{del34} au cours du traitement à l'IFN α

Le patient #40 porte la mutation motrice CALR^{del34} qui est une mutation type 1 « like ». Ce patient a été suivi pendant 49 mois soit 4 ans et un mois. Le NGS dans les PNN a été réalisé au début du traitement qui correspond au début du suivi pour ce patient. Au début du traitement, la mutation CALR^{del34} est détectée à une charge allélique de 54% contre 52% après 44 mois de suivi. Ce patient ne répond donc pas moléculairement au traitement dans les cellules matures. En plus de la mutation CALR^{del34}, nous avons détecté au début du traitement une mutation TP53^{V143M} avec une charge allélique de 7% dans les PNN. De façon inattendue, la charge allélique augmente de 50% (7% à 15%) en 44 mois (figure 24). Ce patient a reçu au début de son traitement de faible dose d'IFN α (67,5 μ g/semaine). La dose a ensuite été augmentée à 135 μ g mais a été espacée de 3 à 4 semaines jusqu'à la fin du suivi (figure 25 A).

Nous avons ensuite comparé les charges alléliques globales des mutations CALR^{del34} et TP53^{V143M} obtenues par discrimination allélique dans les progéniteurs et également dans les cellules matures (pour TP53). Chez ce patient, nous avons déterminé que tous les clones avec la mutation TP53^{V143M} portaient également la mutation CALR^{del34}. Ce qui veut dire que la mutation TP53^{V143M} est un évènement secondaire à la mutation de CALR. Au début du traitement, la charge allélique de CALR^{del34} est d'environ 50% (figure 25 B) ce qui correspond à 100% de cellules mutées à l'état hétérozygote (figure 25 C) dans les progéniteurs engagés (CD34⁺, CD38⁺, CD90⁻) et les progéniteurs enrichis en CSH (CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺). La charge allélique dans ces deux compartiments reste stable au cours de traitement. Dans les progéniteurs immatures (CD34⁺, CD38⁻, CD90⁻), la charge allélique au début du traitement est de 37% et augmente lentement jusqu'à 50%.

Au début du traitement, la charge allélique de la mutation TP53^{V143M} est détectée dans tous les compartiments de progéniteurs aux alentours de 5% dans les progéniteurs immatures contre environ 10% dans les progéniteurs enrichis en CSH et les progéniteurs engagés. De manière intéressante, la charge allélique de TP53^{V143M} n'augmente pas ou très peu pendant 2 ans augmentant de 0% dans les CD90⁺ à 2% par an dans les progéniteurs engagés. Durant les deux années suivantes, la charge allélique de TP53^{V143M} augmente beaucoup plus rapidement dans les trois compartiments.

À la fin du suivi, la charge allélique de $TP53^{V143M}$ diffère entre les trois compartiments de progéniteurs. Dans les $CD38^+$ ($CD34^+$, **CD38**⁺, $CD90^-$) la charge allélique est de 64% après 4 ans de traitement contre 11% 2 ans plus tôt, ce qui veut dire que la charge allélique de ce compartiment a été multipliée par 2,4 chaque année. Dans les $CD90^-$ ($CD34^+$, $CD38^-$, **CD90**⁻) la charge allélique augmente légèrement moins vite avec un taux d'augmentation de 2,25 par an. En revanche, la charge évolue plus rapidement dans les $CD90^+$ ($CD34^+$, $CD38^-$, **CD90**⁺) avec une augmentation 7,4 en 2 ans (figure 25 B).

Au début du traitement, dans la majorité des doubles mutants $CALR^{del34}/TP53^{V143M}$, la mutation de TP53 est retrouvée à l'état hétérozygote. Cependant, on observe dès le début du traitement la présence d'un double mutant homozygote pour $TP53^{V143M}$ dans les compartiments les plus immatures et enrichis en CSH (figure 25 C) qui n'est pas détecté dans le compartiment des progéniteurs engagés ($CD34^+$, $CD38^+$, $CD90^-$) au cours de la première année de suivi. Dans le compartiment immature, la mutation est présente au début du traitement en très faible proportion et n'est plus détectée avant 20 mois de traitement. À la fin du traitement la majorité des clones sont double mutants dans les trois compartiments de progéniteurs (figure 25 C).

Les différences observées sur l'évolution de la charge allélique au cours du temps dans les différents types de progéniteurs se traduit par une évolution différente des double mutants hétérozygotes et homozygotes pour $TP53^{V143M}$. En effet, dans les $CD90^+$ ($CD34^+$, $CD38^-$, **CD90**⁺), le clone $TP53^{V143M}$ hétérozygote est majoritaire par rapport au clone homozygote au début du traitement et pendant les 2 premières années de suivi. En revanche, après 25 mois de traitement, le clone homozygote $TP53^{V143M}$ prend l'avantage et envahi tout le compartiment au détriment des clones simple mutant $CALR^{del34}$ (figure 25 D). En revanche, la dynamique d'évolution des clones est différente dans le compartiment des $CD90^-$ ($CD34^+$, $CD38^-$, **CD90**⁻) avec une augmentation régulière de la proportion des clones hétérozygotes (+ 10% par an) et qui prennent l'avantage à la fin du suivi du patient (figure E). Pour finir, dans le compartiment des progéniteurs engagés $CD38^+$ ($CD34^+$, **CD38**⁺, $CD90^-$), les clones hétérozygotes et homozygotes pour $TP53^{V143M}$ augmentent de la même manière sans observer un avantage particulier de l'un par rapport à l'autre (figure 25 F).

Finalement, au cours du suivi de ce patient, on a observé la présence de double mutant $CALR^{del34}/TP53^{V143M}$ avec une majorité de clones simple mutant pour CALR au début du

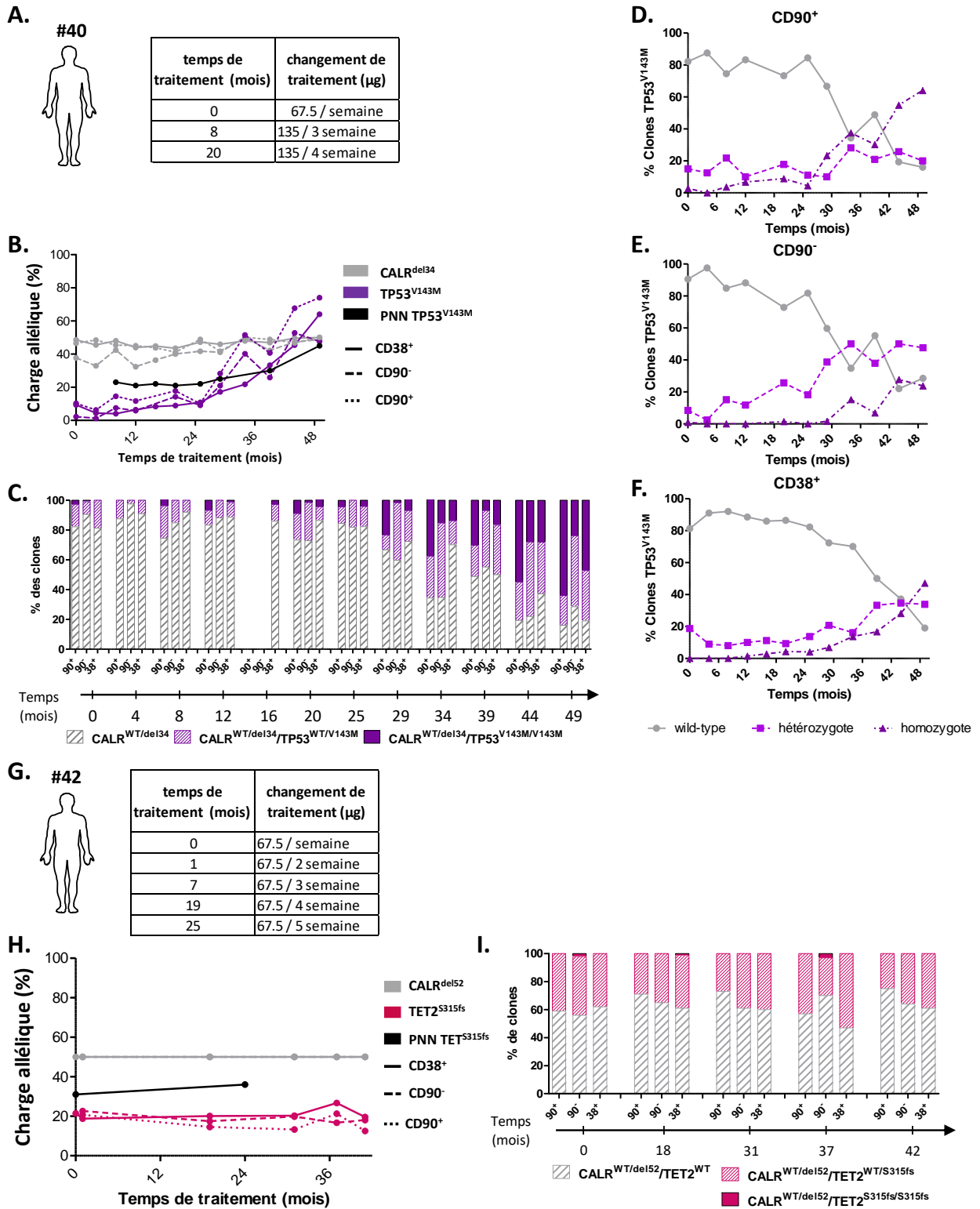


Figure 25 : Mutations associées et motrices, #40 et #42

Architecture clonale des mutations des patients #40 (A à F) et #42 (G à I). (A et G), tableau qui représente les variations de traitements à l'IFN α . B et H représentent la charge allélique des mutations motrices (gris) observées chez les patients et des mutations associées TP53 (violet) ou TET2 (rouge) dans les différents compartiments de progéniteurs ainsi que dans les cellules matures pour la mutation associée (PNN en noir). C et I : représentation de la proportion de chaque type de clone en fonction du statut mutationnel des mutations motrices CALR^{del34} ou CALR^{del52} ainsi que des mutations associées TP53^{V143M} ou TET2^{S315fs}. D, E, F : comparaison de l'évolution des clones hétérozygotes, homozygotes ou WT pour TP53^{V143M} selon le type de progéniteurs. CD90⁺ = CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺; CD90⁻ = CD34⁺, CD38⁺, CD90⁻, CD38⁺, CD90⁻.

traitement. Un clone $TP53^{V143M}$ homozygote est présent dès le début du traitement dans le compartiment des progéniteurs enrichis en CSH. Ce clone homozygote prend l'avantage au cours du traitement dans ce même compartiment. Bien qu'il soit détecté dans les deux autres compartiments, il prend moins l'avantage dans les $CD90^-$. À la fin du traitement, les clones double mutants sont majoritaires quel que soit le compartiment de progéniteurs. Ce qui veut dire que la mutation $TP53^{V143M}$ confère un avantage prolifératif aux cellules qui portent la mutation $CALR^{del34}$ en présence du traitement.

a. Patient #42 : Évolution de la mutation $TET2^{S315fs}$ et $CALR^{del52}$ au cours du traitement à l'IFN α

Le patient #42 porte la mutation motrice $CALR^{del52}$ et a été suivi pendant 42 mois soit 3 ans et demi. L'analyse par NGS des PNN de ce patient a révélé, en plus de la mutation $CALR^{del52}$ à 55%, la présence de la mutation $TET2^{S315fs}$ à hauteur de 31%. Un séquençage NGS a été réalisé au cours du suivi et a permis de montrer qu'après 25 mois de traitement, la charge allélique de la mutation de $TET2$ a augmenté de 7% et que la mutation de $CALR$ était de 51% (figure 24). Ce patient ne répond donc pas moléculairement au traitement pour la mutation $CALR^{del52}$. Aucun prélèvement n'a été séquençé à la fin du traitement.

Ce patient a reçu tout au long de son traitement des doses de 67,5 μ g d'IFN α . Cette dose lui a été administrée chaque semaine au début du traitement puis les doses ont été progressivement espacées (figure 25 G).

La mutation $TET2^{S315fs}$ est détectée à une charge plus faible dans les progéniteurs par rapport au PNN tout au long du traitement. Globalement, la charge allélique de $TET2^{S315fs}$ évolue peu au cours du traitement. Elle a tendance à diminuer au cours du traitement dans les $CD90^+$ (figure 25 H).

En réalisant l'architecture clonale de ces mutations, nous avons déterminé que la mutation $TET2^{S315fs}$ était retrouvée exclusivement dans des clones $CALR^{del52}$ ce qui implique qu'il s'agit d'un événement secondaire. La mutation de $TET2$ est présente à l'état hétérozygote. On retrouve parfois quelques clones homozygotes pour $TET2^{S315fs}$ mais la détection de ces clones reste un événement assez rare. La proportion des double mutants est constante dans les compartiments immatures et engagés. À noter que dans le compartiment le plus immature, la proportion de double mutant diminue de 15 % (figure 25 I).

En conclusion, on a pu déterminer chez ce patient que les mutations de *TET2* et de *CALR* étaient présentes dans le même clone. La proportion des double mutants reste relativement constante dans les différents compartiments des progéniteurs immatures et engagés. Dans le compartiment des progéniteurs immatures enrichis en CSH, la proportion du clone double mutant semble diminuer lentement au cours du suivi à l'IFN α .

b. Patient #31 : Évolution de la mutation *TET2*^{H193fs} et *JAK2*^{V617F} au cours du traitement à l'IFN α

Nous avons commencé à suivre le patient #31 deux ans après le début du traitement à l'IFN α . Ce patient a été traité pendant 93 mois soit 7 ans et 9 mois. Au début du suivi, nous avons déterminé par NGS que ce patient était muté à 80% *JAK2*^{V617F} dans les cellules matures mais portait également la mutation *TET2*^{H193fs} à hauteur de 9%. Après 72 mois de traitement, nous avons déterminé que la charge allélique de *TET2*^{H193fs} dans les PNN avait augmenté jusqu'à 32% tandis que le patient était en réponse moléculaire partielle (RMP) pour la mutation *JAK2*^{V617F} avec une diminution de plus de 50% par rapport au début du suivi (figure 24). Au cours du traitement, ce patient a suivi plusieurs changements de doses d'IFN α , en particulier après 42 mois de traitement, le patient reçoit une dose d'IFN α diminuée de moitié. Après cela, les doses d'IFN α sont de plus en plus espacées jusqu'à 67 mois de traitement où la dose d'IFN α est encore diminuée (figure 26 A).

En comparant la charge globale de la mutation dans les PNN pour *TET2*^{H193fs} et dans les progéniteurs pour les deux mutations *TET2* et *JAK2*, on a pu observer que jusqu'à 67 mois de traitement, les charges alléliques des mutations de *TET2* et de *JAK2* suivent une dynamique opposée. De manière intéressante, tandis que la charge allélique de *JAK2*^{V617F} diminue, la charge allélique de *TET2*^{H193fs} augmente (de 24 à 42 mois). Entre 48 et 67 mois de traitement, la charge allélique dans les progéniteurs et les PNN est stable quelle que soit la mutation. En revanche, après 67 mois de traitement les charges alléliques de *JAK2*^{V617F} et *TET2*^{H193fs} diffèrent dans les CD90⁺ par rapport aux autres compartiments (figure 26 B).

Chez ce patient, nous avons déterminé que les mutations de *JAK2* et de *TET2* apparaissent dans deux clones indépendants. La mutation *JAK2*^{V617F} est présente majoritairement à l'état homozygote et la mutation *TET2*^{H193fs} majoritairement à l'état hétérozygote, bien que l'on trouve parfois quelques clones homozygotes pour *TET2*^{H192fs} surtout dans les progéniteurs CD38⁺ (figure E). Dès le début du suivi, on observe que la majorité des clones qui ne sont pas

mutés $JAK2^{V617F}$ sont mutés pour $TET2$ dans les différents compartiments de progéniteurs (figure 26 C, D et E).

Par ailleurs, dans le compartiment des progéniteurs enrichis en CSH (figure C), les cellules WT ne sont pratiquement plus détectables après 47 mois de traitement contrairement aux compartiments plus engagés où des colonies WT sont détectées à chaque point de suivi (figure 26 D et E).

En conclusion, le suivi des mutations $TET2^{H193fs}$ et $JAK2^{V617F}$ chez ce patient a permis de déterminer que ces deux mutations étaient indépendantes. Lorsque le clone $JAK2^{V617F}$ est ciblé par le traitement à l'IFN α , la proportion de clone $TET2^{H193fs}$ augmente, tandis que lorsque le clone $JAK2^{V617F}$ n'est plus ciblé, il s'amplifie de nouveau au détriment du clone $TET2^{H193fs}$. Ces données suggèrent que le clone $TET2^{H193fs}$ est plus résistant à l'IFN α . Ainsi, nous avons observé plusieurs phases d'évolution des deux mutations au cours du traitement qui concorde avec des modifications importantes dans la dose du traitement reçu par le patient.

c. Patient #26 : Évolution de la mutation $DNMT3A^{R771X}$ et $JAK2^{V617F}$ au cours du traitement à l'IFN α

Le patient #26 a été suivi au laboratoire 4 ans après arrêt du traitement à l'IFN α pendant 13 mois puis nous avons arrêté de suivre ce patient pendant 3 ans. Le patient a ensuite reçu 67,5 μ g d'IFN α chaque semaine sans modification du traitement 48 mois après le début de l'étude (figure 26 F et G). À partir de ce moment nous avons repris le suivi de ce patient. Le séquençage NGS des PNN n'a pas permis de détecter de mutation autre que la mutation $JAK2^{V617F}$. En revanche, après 10 mois de suivi, une mutation de $DNMT3A$ est présente à 2% (figure 24). Pour ce patient, nous avons étudié la dynamique de la mutation $DNMT3A^{R771X}$ pour déterminer si elle était retrouvée également au niveau des progéniteurs dès le début ou bien si elle était apparue au cours du suivi.

Étant donnée la faible proportion d'allèle muté détecté dans les cellules matures, nous n'avons pas étudié la charge allélique de $DNMT3A^{R771X}$ dans les PNN ; la méthode TaqMan n'étant pas suffisamment sensible pour de si faible proportion. En revanche, nous avons pu étudier les différents types de progéniteurs et avons observé la présence de la mutation au début du suivi avec une charge allélique qui reste relativement faible. Ce patient, avait une charge allélique de $JAK2^{V617F}$ qui était également très faible au début du suivi.

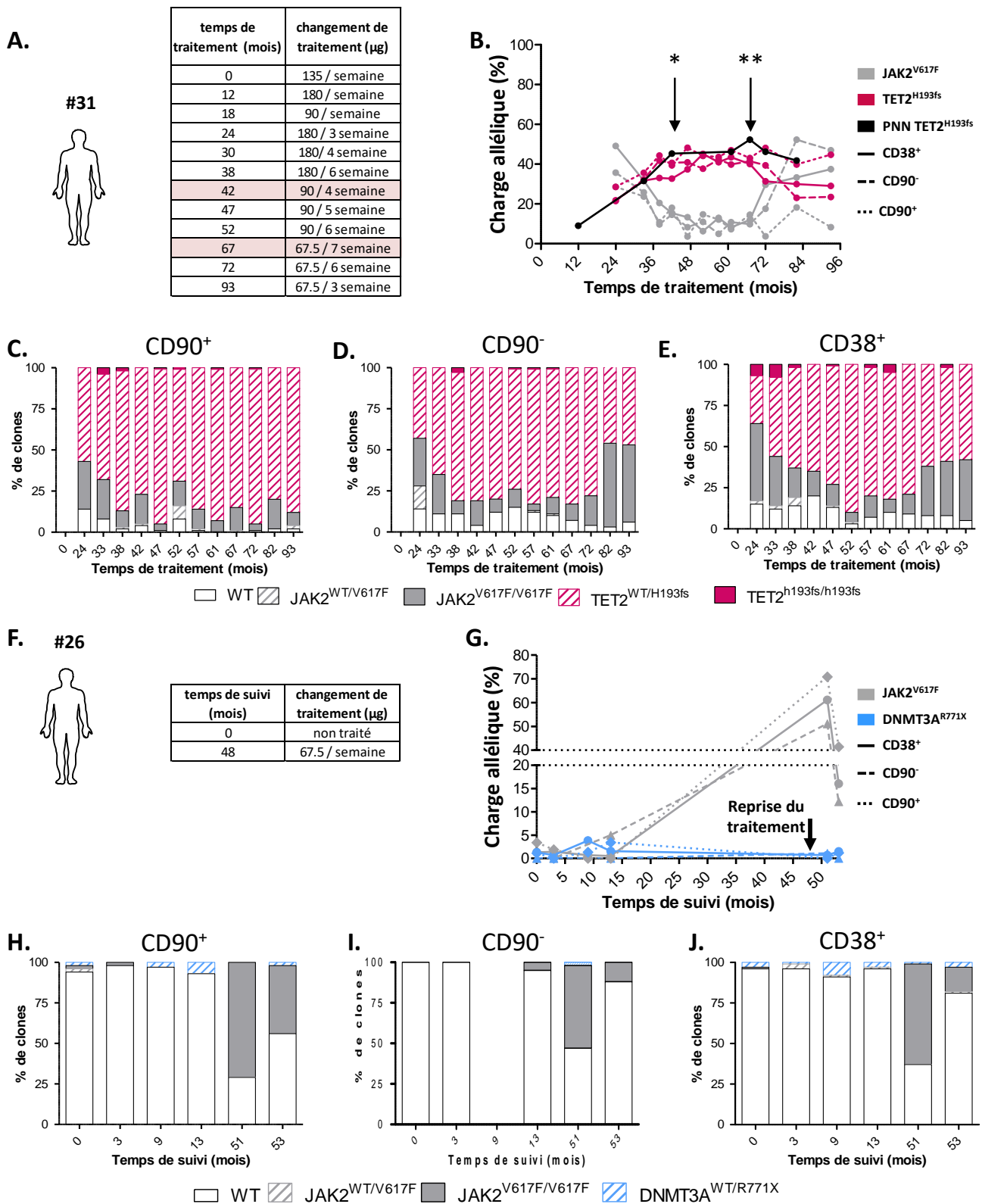


Figure 26 : Mutations associées et motrices, patients #31 et #26

Architecture clonale des mutations des patients #31 (A à E) et #26 (F à J). (A et F), tableau qui représente les variations de traitements à l'IFN α . B et G représentent la charge allélique des mutations motrices (gris) observée chez les patients et des mutations associées TET2 (rouge) ou DNMT3A (bleu) dans les différents compartiments de progéniteurs ainsi que dans les cellules matures pour la mutation associée (PNN en noir). C, D, E, H, I, J : représentation de la proportion de chaque type de clone en fonction du statut mutationnel des mutations motrices JAK2^{V617F} ainsi que des mutations associées TET2^{H193fs} (C, D et E) ou DNMT3A (H, I et J). CD90⁺=CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺; CD90⁻ = CD34⁺, CD38⁻, CD90⁻, CD38⁺ = CD34⁺, CD38⁺, CD90⁻.(*) et (**) correspondent à deux points de suivi où le traitement a été modifié (Cf. tableau A ligne surlignée en rose).

Après 48 mois de suivi, la charge allélique de $JAK2^{V617F}$ a largement augmenté (85%) soulignant une rechute de la maladie et le patient a de nouveau été mis sous traitement à l'IFN α . De manière intéressante, la charge allélique de $JAK2^{V617F}$ diminue drastiquement en seulement 2 mois sous IFN α (figure 26 G). En analysant le statut mutationnel des progéniteurs, nous avons constaté que la mutation de $DNMT3A$ est détectée dès le début du suivi dans les progéniteurs $CD90^+$ et les $CD38^+$ contrairement au $CD90^-$ tout comme la mutation de $JAK2$ (figure 26 H, I, J). Les mutations de $DNMT3A$ et de $JAK2$ sont dans des clones indépendants. De plus, alors que la mutation de $DNMT3A$ est détectée uniquement à l'état hétérozygote, $JAK2^{V617F}$ est présente à l'état hétérozygote et homozygote. La charge allélique de $DNMT3A^{R771X}$ semble augmenter durant les treize premiers mois de suivi contrairement à $JAK2^{V617F}$ qui reste très faible. Après 51 mois de suivi, la mutation $DNMT3A^{R771X}$ n'est pas détectée dans les $CD90^+$ et est de 1 et 2% dans les $CD38^+$ et les $CD90^-$ respectivement. En revanche, sur la même période, la mutation $JAK2^{V617F}$ est retrouvée uniquement à l'état homozygote avec une prise d'avantage conséquente. En deux mois, les clones homozygotes $JAK2^{V617F}$ diminuent fortement dans les 3 compartiments de progéniteurs et la mutation $DNMT3A^{R771X}$ apparaît dans les $CD90^+$ et augmente dans les $CD38^+$.

En conclusion, on a pu déterminer que les mutations $DNMT3A^{R771X}$ et $JAK2^{V617F}$ sont dans des clones séparés. Par ailleurs, les clones $DNMT3A^{R771X}$ sont présents dans les progéniteurs dès le début du suivi. La proportion de ces clones augmente lorsque $JAK2^{V617F}$ diminue en l'absence de traitement à l'IFN α . La reprise du traitement induit une diminution de $JAK2^{V617F}$ au profit des clones $DNMT3A^{R771X}$. Ces données suggèrent qu'ils ont moins d'avantage que les clones $JAK2^{V617F}$ mais qu'ils sont plus résistants à l'IFN α . Il semblerait donc que la détection de la mutation de $DNMT3A$ chez ce patient dépend du ciblage de $JAK2^{V617F}$.

d. Évolution de la mutation *DNMT3A*^{E463fs} et *MPL*^{W515K} au cours du traitement à l'IFN α

Le patient #47 porte la mutation motrice *MPL*^{W515K} et a été suivi dès le début du traitement à l'IFN α . Ce patient a reçu au départ de faibles doses d'IFN α (67,5 μ g /semaine) qui ont été rapidement augmentées à 135 μ g toutes les deux semaines. Les doses d'IFN α ont été progressivement espacées au cours du traitement (figure 27 A). Au début du traitement, des mutations de *MPL* (37%) mais également de *SH2B3* ont été détectées dans les PNN. Après 42 mois de traitement, la mutation de *SH2B3* n'est plus détectée. Cependant, des mutations de *TET2*, *DNMT3A* et d'*EZH2* ont été détectées à hauteur de 4 à 5% par NGS. À la fin du suivi, la charge allélique de la mutation de *MPL* a fortement diminué classant ce patient en RMP (figure 24).

Chez ce patient, la mutation *MPL*^{W515K} est présente au début du traitement dans les différents types de progéniteurs et diminue au cours du traitement de façon assez importante.

De manière intéressante chez ce patient, le compartiment des CD90⁺ semble moins rapidement ciblé pour la mutation de *MPL* que les deux autres compartiments de progéniteurs pendant les 2 premières années du traitement. La charge allélique de *DNMT3A*^{R771X} est relativement stable dans les trois compartiments. En parallèle, la mutation *DNMT3A*^{R771X} est détectée dès le début du traitement dans les CD90⁻ mais pas dans les CD90⁺ (figure 27 B, C, D et E) puis elle devient détectable dans les CD90⁺ après 1 mois de traitement (figure 27 C).

En s'intéressant plus particulièrement au statut mutationnel des colonies issues des CD90⁺, CD38⁺ et des CD90⁻, on constate que les mutations de *MPL* et de *DNMT3A* sont dans des clones séparés. Ces deux mutations sont détectées majoritairement à l'état hétérozygote bien que quelques clones homozygotes soient présents (figure 27 C, D et E).

On remarque qu'au cours du traitement, la proportion de clone *MPL*^{W515K} diminue conduisant à une augmentation de la proportion de cellules WT et de cellules *DNMT3A*^{E463fs} dans les différents compartiments de progéniteurs.

Pour résumer, on a pu déterminer que les mutations de *DNMT3A* et de *MPL* étaient dans des clones séparés. Les cellules *MPL*^{W515K} sont ciblées par l'IFN α contrairement aux cellules *DNMT3A*^{E463fs}.

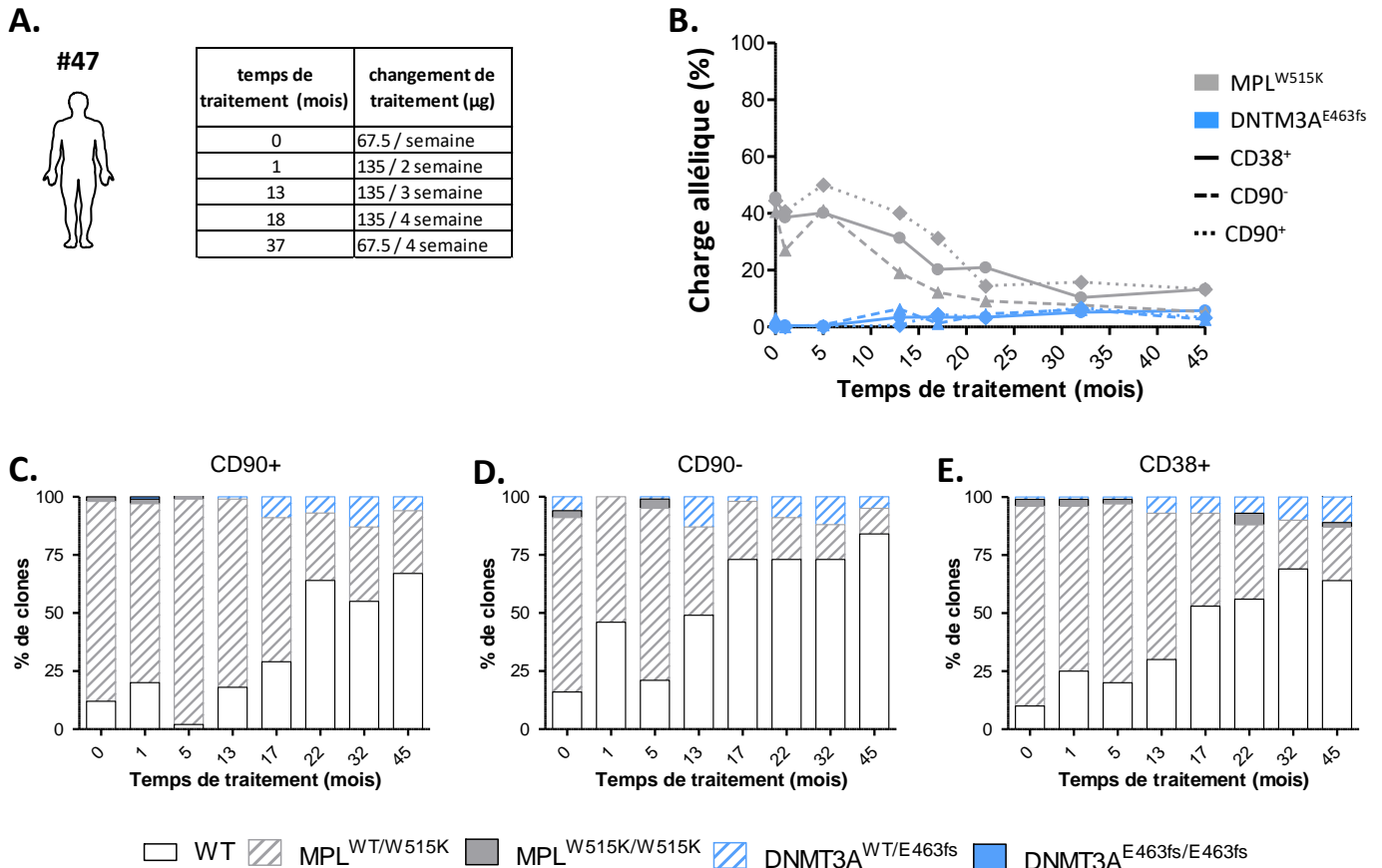


Figure 27 : Patient #47, Architectures clonales des mutations DNMT3A^{E463fs} et MPL^{W515K}

A : tableau qui représente les variations de traitements à l'IFN α . B représente la charge allélique de la mutation motrice MPL^{W515K} (gris) et de la mutation associée DNMT3A^{E463fs} (bleu) dans les différents compartiments de progéniteurs. C, D, E : représentation de la proportion de chaque type de clone en fonction du statut mutationnel des mutations motrices et associées et selon le type de progéniteurs. CD90⁺=CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺; CD90⁻=CD34⁺, CD38⁻, CD90⁻, CD38⁺=CD34⁺, CD38⁺, CD90⁻.

En conclusion, la comparaison de l'architecture clonale des mutations associées et motrices a permis de voir pour deux patients qui portent des mutations CALR^m que les mutations associées sont retrouvées exclusivement dans les clones CALR^m et donc que l'apparition de ces mutations est un évènement secondaire. Dans ces 2 cas, les clones doubles mutants ne sont pas ciblés par l'IFN α puisque les mutations associées ont des fractions clonales stables voire même qui augmentent dans le cas de TP53^{V143M}. On a observé une amplification en particulier du clone muté pour TP53 à l'état homozygote. Ceci montre que la mutation de TP53, en particulier à l'état homozygote, donne un avantage prolifératif aux cellules. Il est également possible que le traitement à l'IFN α amplifie le clone TP53^{V143M} homozygote.

Les mutations des facteurs de l'épigénétique (TET2 et DNMT3A) que nous avons étudiés pour 3 patients ont été retrouvées dans des clones indépendants des mutations motrices de JAK2

ou MPL. Les clones mutés pour TET2 ou DNMT3A ne sont pas ciblés par l'IFN α contrairement aux clones avec les mutations motrices. La variation de leur fraction clonale dépend du ciblage des JAK2^{V617F} ou MPL^{W515K} et ne semble pas s'amplifier avec l'IFN α . Ces résultats suggèrent pour ces 3 patients que les clones portant les mutations de facteurs de l'épigénétique isolées ont moins d'avantage prolifératif que les clones portant les mutations motrices lors de la maladie mais qu'ils sont plus résistants au traitement à l'IFN α .

PARTIE 3 : ÉTUDE DE LA SIGNALISATION DE L'INTERFÉRON DANS LES LIGNÉES CELLULAIRES MURINES $JAK2^{V617F}$ OU $CALR^{DEL52}$

Introduction

Notre laboratoire a déjà montré dans le modèle murin et dans les patients sous traitement que l'IFN α cible spécifiquement les cellules $JAK2^{V617F}$. Par ailleurs, nous avons déterminé que son efficacité est corrélée au niveau de signalisation de $JAK2^{V617F}$ puisque les cellules $JAK2^{V617F}$ homozygotes sont ciblées plus rapidement que les hétérozygotes. De plus nous avons montré que chez l'Homme, la réponse au traitement diffère entre les patients portant la mutation $JAK2^{V617F}$ et $CALR^m$ (Salma Hasan et al. 2013; S Hasan et al. 2014; Mosca et al. 2021). Notre hypothèse est que $JAK2^{V617F}$ induit soit un amorçage indirect de la signalisation IFN α puisque MPL/JAK2 active également STAT1 ou bien direct *via* une hétérodimérisation illégitime avec JAK1, TYK2 ou IFNAR1/2. Ceci conduirait à une sur-signalisation de la voie JAK/STAT médiée par l'IFN α et à un plus grand ciblage par apoptose, sénescence, arrêt du cycle cellulaire et/ou perte d'autorenouvellement. Il est également possible que l'effet de $JAK2^{V617F}$ passe à la fois par un amorçage indirect et direct de l'IFN α (figure 28 A et B). Pour investiguer l'effet de l'IFN α sur la signalisation, j'ai utilisé des lignées cellulaires Ba/F3 $JAK2^{V617F}$ ou $CALR^{del52}$ ainsi que des cellules primaires de patients.

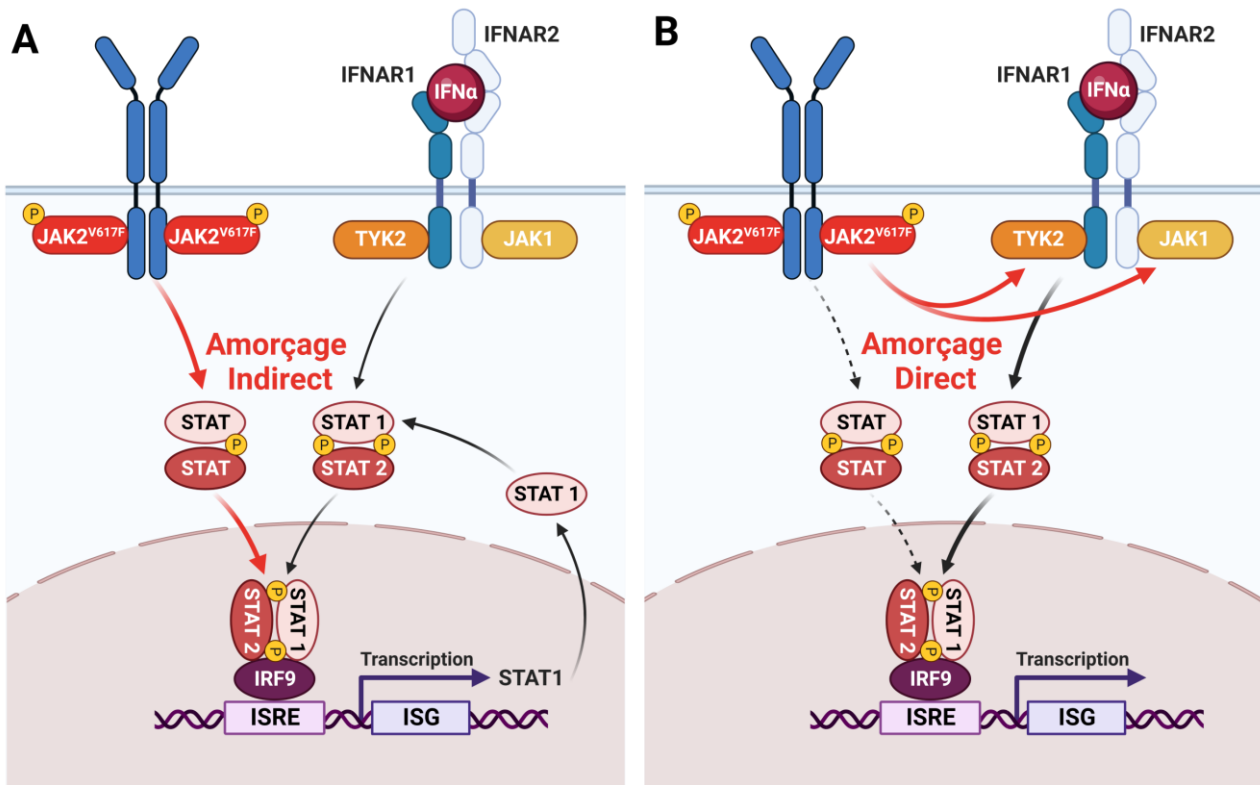


Figure 28 : Hypothèses de l'amorçage de la voie de l'IFN α par JAK2^{V617F}

(A) modèle d'amorçage indirect de la signalisation à l'IFN α en induisant l'expression d'ISG dont STAT1. (B) modèle d'amorçage direct de la voie de l'IFN α impliquant une dimérisation de JAK2^{V617F} et des protéines de la voie de l'IFN α tel que JAK1, TYK2 ou bien IFNAR1/2.

Matériels et méthodes

Lignées cellulaires Ba/F3

J'ai utilisé comme modèle, les lignées Ba/F3, qui sont des progéniteurs de lymphocytes B murins dépendant de l'IL-3. Ces cellules ont été transduites par un rétrovirus afin qu'elles surexpriment JAK2^{WT}, CALR^{WT} ou qu'elles expriment les mutants JAK2^{V617F} ou CALR^{del52}. Pour la plupart des expériences, j'ai utilisé des lignées cellulaires infectées pour qu'elles expriment également le récepteur MPL. Pour comparer les effets de la mutation de JAK2^{V617F} en fonction de l'expression des récepteurs, j'ai également utilisé des lignées qui expriment EPOR et surexpriment JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F}. Au total j'ai utilisé 8 lignées Ba/F3 : JAK2^{WT}; JAK2^{V617F}; MPL-JAK2^{WT}; MPL-JAK2^{V617F}; MPL-CALR^{WT}; MPL-CALR^{del52}; EPOR-JAK2^{WT}; EPOR-JAK2^{V617F}.

Ces cellules sont maintenues en culture cellulaire dans un milieu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle Medium*) supplémenté de sérum de veau fœtal (SVF) (10%), pénicilline/streptomycine (P/S) (1%), glutamine (1%) et un surnageant de cellules WEHI qui produisent l'IL-3 (5%).

Cellules primaires humaines

On utilise comme contrôles des progéniteurs CD34⁺ issues de cytophèreses de donneurs sains préalablement mobilisés au G-CSF. On obtient alors un prélèvement enrichi en progéniteurs hématopoïétiques.

Les cellules progénitrices JAK2^{V617F} proviennent de prélèvements sanguins de patients atteints de PV/MF (PV évoluant vers une Myélofibrose). Ces patients portent la mutation JAK2^{V617F} à l'état homozygote avec une charge allélique de 100%. Ces prélèvements proviennent de l'hôpital Saint Louis et ont été collectés après avoir signé un consentement éclairé et une déclaration à la CNIL.

Extraction des populations sanguines

Afin d'étudier l'effet de l'IFN α *in vitro* sur les cellules primaires, il faut les isoler à partir des échantillons de sang. Les cellules mononuclées (CMN) contenant les lymphocytes et les progéniteurs CD34⁺ de patients sont isolées à l'aide d'un gradient de densité sur ficoll (20 ml de ficoll pour 30 ml d'échantillon de sang). Puis, on centrifuge à 2200 rpm pendant 20 minutes à 20°C.

Une fois les CMN isolées, on enrichit uniquement les progéniteurs hématopoïétiques (CD34⁺). Pour cela, on utilise des billes magnétiques couplées à un anticorps dirigé contre le marqueur de surface CD34. On utilise des billes couplées à un Fc dirigé contre les CD34⁺ et

un Fc blocker (pour éviter les fixations non-spécifiques). On passe ensuite les échantillons à l'AUTOMACS, un appareil qui contient un aimant et qui permet de purifier une population de cellules grâce aux anticorps couplés aux billes magnétiques. Cette étape permet d'avoir une population enrichie en cellules CD34⁺. Une fois les progéniteurs CD34⁺ isolés, les cellules sont lavées et mise en culture.

Culture cellulaire des progéniteurs issus de patients et de sujets sains

Les cellules sont ensuite mises en culture dans un milieu sans sérum (MSS) composé d'un milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) supplémenté par un mélange de lipides soniqués (cholestérol, acide oléique, 3L-dipalmitoyl phosphatidylcholine), d'insuline-transferrine (1X, Gibco, réf : 41400-045) et de BSA (bovin serum albumin) (1,5%) en présence de TPO (20 ng/mL), de SCF (25 ng/mL), de FLT3-L (10 ng/mL), d'IL-3 (10 ng/ml) et d'IL-6 (10 ng/ml). Le milieu contient également de la pénicilline et de la streptomycine (P/S) (1%).

Expériences sur les cellules primaires humaines

Expériences effets doses de l'IFN α (cellules de patients et de donneurs)

Après 5 jours de culture, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS 1X + EDTA 0,1%. Elles sont ensuite sevrées en cytokines dans du milieu IMDM + P/S (1%) + d' α -monothioglycérol (1%) pendant 6 heures à 300 000 cellules/mL.

Après 6 heures de sevrage en cytokines, on stimule les cellules à l'IFN α (humain) 15 minutes à des doses croissantes (0 / 10/100 / 1000 U/ml) pour pouvoir analyser l'effet au niveau de la signalisation par Western Blot. On effectue la même expérience en parallèle avec une stimulation à l'IFN α pendant 3 heures pour pouvoir ensuite analyser l'effet de la stimulation sur l'expression de gènes cibles de l'IFN α par qRT-PCR (*real time reverse transcription polymerase chain reaction*). Après lavage, les culots cellulaires sont conservés à -80°C.

RNAseq avant et après IFN α (cellules de patients et de donneurs)

Des cellules CD34⁺ provenant de 4 patients JAK2^{V617F} avec une charge allélique de 100% ainsi que de 4 contrôles ont été sevrées en cytokines après 5 jours de culture puis stimulées ou non à l'IFN α humain à 500 UI/ml. L'ARN total provenant de ces cellules a été isolé à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les données provenant des échantillons sans traitement à l'IFN α ont fait l'objet d'une publication dans Blood Cancer Discovery (voir en annexe)(Murakami et al. 2022). Les échantillons ont été séquencés comme décrit dans l'article.

Expériences sur les lignées (Ba/F3)

Effet dose de l'IFN α dans les lignées MPL-JAK2^{WT} et MPL-JAK2^{V617F}

De la même manière que pour les CD34⁺ issus des patients, les lignées cellulaires Ba/F3 sont sevrées en cytokines pendant 6 heures à 700 000 cellules/ml. Les cellules sont ensuite stimulées à l'IFN α (murin) 15 minutes pour l'analyse par western blot (WB) et 3 heures pour l'analyser par qRT-PCR à des doses croissantes (0/ 100/ 1000/ 10 000 UI/ml). Après lavage, les culots cellulaires sont conservés à -80°C.

Effet temps de l'IFN α dans les lignées MPL-JAK2^{WT} et MPL-JAK2^{V617F}

Pour observer l'effet de l'IFN α , les lignées ont été traitées à l'IFN α ou non à 500 UI/ml après avoir été sevrées en cytokines. La stimulation à l'IFN α est ensuite stoppée à des temps différents entre 15 minutes et 3 heures. Les effets sur l'activation de la voie de l'IFN α sont analysés par WB.

Effet des inhibiteurs de JAK2 et JAK1 sur les niveaux d'expression de STAT1 dans les lignées MPL-JAK2^{WT} et JAK2^{V617F}

Pour déterminer l'effet des inhibiteurs de JAK2 sur les niveaux d'expression de STAT1 dans les lignées, nous avons utilisé deux inhibiteurs de type 1 (qui se fixent sur la forme phosphorylée de JAK2 et bloquent son activité) : le Ruxolitinib (1000nM) qui inhibe JAK1 et JAK2 et le BMS91143 (1000nM) qui inhibe spécifiquement JAK2 ainsi que le CHZ868 (100nM) qui est un inhibiteur de type 2 (qui se fixe sur la forme non phosphorylée de JAK2). Les cellules en culture ont d'abord été lavées et remises en culture en l'absence d'IL-3, puis elles ont été exposées aux inhibiteurs et récoltées après 3 à 9 heures de traitement. L'expression de STAT1 a ensuite été analysée par RT-qPCR.

Comparaison JAK2^{V617F} et CALR^{del52}

Pour comparer l'effet de l'IFN α selon les mutations CALR^{del52} et JAK2^{V617F}. Les lignées MPL-CALR^{WT}, MPL-CALR^{del52}, MPL-JAK2^{WT}, MPL-JAK2^{V617F} ont été stimulées à l'IFN α à 500 UI/ml pendant 15 minutes. Les cellules ont été sevrées et conservées de la même façon que dans les expériences décrites précédemment. Des culots secs de cellules sans stimulation à l'IFN α ont été réalisés pour comparer les niveaux d'expression des STAT par Western Blot.

Comparaison des lignées JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} en fonction des récepteurs MPL et EPOR

Nous avons procédé de la même manière que pour la comparaison de JAK2^{V617F} et CALR^{del52} en utilisant les lignées exprimant JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} selon l'expression ou non des récepteurs EPOR et MPL. Des culots secs de cellules sans stimulation à l'IFN α ont été réalisés pour comparer les niveaux d'expression des ISG basales dans ces lignées par RT-qPCR.

Analyses des effets de la stimulation sur la signalisation par Western Blot

Après avoir été extraites dans un tampon Laemmli et soniquées, les protéines sont séparées selon leur taille sur un gel d'acrylamide, transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées à l'aide d'un anticorps spécifique dirigés contre la protéine d'intérêt (ACTINE, P-STAT1, STAT1, P-STAT2, STAT2, P-JAK2, JAK2) dilué au 1/1000 (selon les recommandations du fournisseur Cell Signaling).

Effets de la stimulation de l'IFN α sur l'expression de ses gènes cibles

Extraction d'ARN

L'ARN est extrait à partir des culots secs qui sont resuspendus et lysés dans du Trizol. Les échantillons sont incubés dans la glace 5 minutes puis vortexés. On ajoute ensuite du chloroforme avant de vortexer à nouveau. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000 rpm, 20 minutes à 4°C. On ajoute de l'isopropanol à la phase aqueuse pour précipiter l'ARN. Les tubes sont vortexés de nouveau puis centrifugés à 13 000 rpm, 20 minutes à 4°C. Les ARN sont lavés à l'éthanol 70%, centrifugés à 13 000 rpm, 20 minutes à 4°C, réhydratés dans de d'H₂O dépourvue d'RNase puis stockés à -80°C.

RT-PCR et qPCR

La rétro-transcription de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) est effectuée dans un thermocycleur en utilisant la SuperScript™ II Reverse Transcriptase de chez Invitrogen selon les recommandations du fournisseur.

À partir de cet ADNc, on réalise une PCR quantitative en temps réel en utilisant du TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNase H Plus) de chez TAKARA ainsi que des amorces spécifiques des gènes d'intérêt en suivant les recommandations du fournisseur. Les échantillons sont analysés en duplicata dans un « 7500 Real Time PCR System » (Applied Biosystem). Les résultats ont été analysés avec la méthode du ddCT par rapport au contrôle.

Résultats

a. Effet de l'IFN α sur les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{V617F} et CALR^{del52}

Pour déterminer l'effet de JAK2^{V617F} sur la signalisation induite par l'IFN α , je me suis servie tout d'abord des lignées cellulaires Ba/F3 MPL-JAK2^{WT} et MPL-JAK2^{V617F}. Je les ai stimulées à l'IFN α à différentes doses à un temps court (figure 29 A et B) et à différents temps (figure 29 C) afin d'observer l'activation de la voie de la signalisation.

Dans le cas de JAK2^{V617F}, on observe une augmentation de l'expression de la protéine STAT1 par rapport à JAK2^{WT} contrairement à STAT2 qui est exprimée de la même manière dans le cas de JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} (figure 29 A, B). Par ailleurs, STAT1 et potentiellement STAT2 sont phosphorylées même en absence de stimulation à l'IFN α , uniquement dans les lignées JAK2^{V617F}. Lorsque les cellules sont stimulées à l'IFN α , les STAT sont phosphorylées de manière doses dépendantes en présence de JAK2^{WT} et JAK2^{V617F} mais de façon d'autant plus importante dans le cas de JAK2^{V617F}. On observe également une phosphorylation des STAT très importante à différents temps (15 minutes à 1 heure) qui diminuent ensuite en contexte JAK2^{V617F} tandis que pour JAK2^{WT} la phosphorylation est moins forte et constante au cours du temps. Ces résultats montrent que JAK2^{V617F} sensibilise à l'IFN α (figure 29 C).

Après avoir déterminé les effets de l'IFN α dans le cas de JAK2^{V617F}, nous avons voulu comparer les effets de l'IFN α en présence de JAK2^{V617F} et de CALR^{del52}. Dans la figure D, les résultats pour JAK2^{V617F} et CALR^{del52} sont réalisés sur deux Western Blot différents. On ne peut donc pas comparer réellement les deux ensembles. En revanche on peut comparer les différences entre JAK2^{V617F} et JAK2^{WT} et comparer si on observe les mêmes différences entre CALR^{WT} et CALR^{del52}. On observe encore une fois dans ce western blot une augmentation de l'expression de STAT1 en présence de JAK2^{V617F} comparé à JAK2^{WT} avec une sensibilisation à l'IFN α (augmentation de la phosphorylation de STAT1). Dans le cas de CALR^{del52}, on n'observe pas de différence d'expression de STAT1 par rapport à CALR^{WT}. Par ailleurs, on observe une phosphorylation de STAT1 à l'état basal qui n'est pas augmentée sous traitement à l'IFN α . Ces résultats montrent que CALR^{del52} ne sensibilise pas les cellules à l'IFN α contrairement à JAK2^{V617F}.

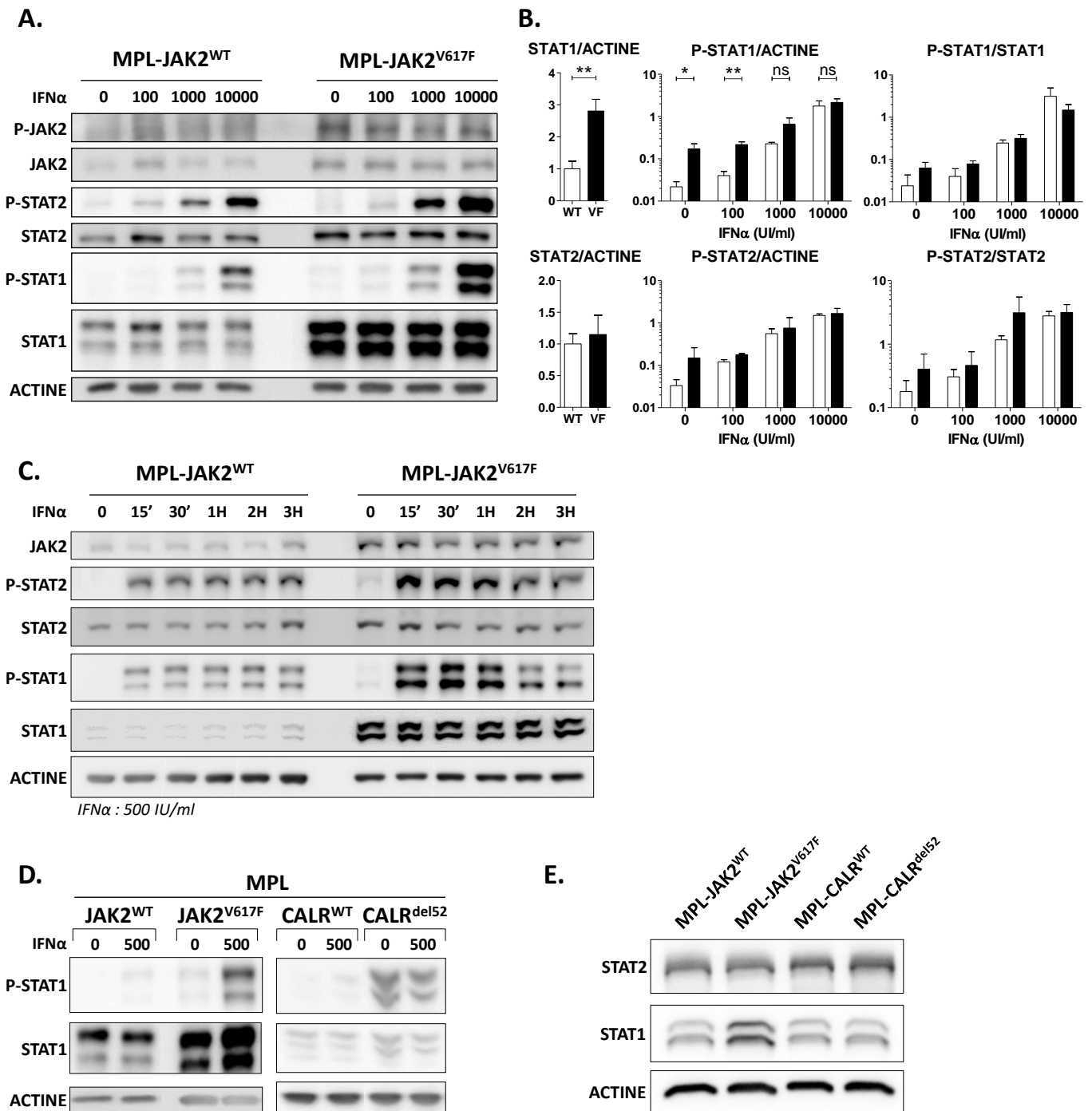


Figure 29 : Effet de l'IFN α dans les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{V617F} et CALR^{del52}

(A) Effet dose de l'IFN α dans les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{WT} et MPL-JAK2^{V617F} sur l'expression et l'activation de STAT1 (n=3) et STAT2 (n=2). (B) Quantification des protéines dans les lignées JAK2^{WT} (blanc) et JAK2^{V617F} (noire) des WB en A; STAT1/ACTINE et PSTAT1/ACTINE (n=3), PSTAT1/STAT1, STAT2/ACTINE, PSTAT2/ACTINE et PSTAT2/ACTINE (n=2). (C) Effet temps de l'IFN α (500 UI/ml) dans les lignées Ba/F3 MPL-JAK2^{WT} et MPL-JAK2^{V617F} sur l'expression et l'activation des STAT 1 et 2 (n=3). (D) Différences d'expression de STAT1 et STAT2 en fonction des JAK2 WT ou V617F et CALR WT ou del52 (n=2). (E) Effet du traitement à l'IFN α dans les lignées JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} (n=4) ainsi que dans les lignées CALR^{WT} ou CALR^{del52} (n=2).

J'ai également réalisé une expérience pour comparer les niveaux d'expression de STAT1 et STAT2 à l'état basal dans les lignées qui expriment $JAK2^{V617F}$ et $CALR^{del52}$. Dans cette expérience, on observe une augmentation de l'expression de STAT1 uniquement dans le cas de $JAK2^{V617F}$, tandis que son expression est comparable entre les lignées $CALR^{del52}$ et les lignées WT pour CALR et JAK2. Dans le cas de STAT2, on n'observe pas de différence de niveau d'expression entre les différentes conditions (figure 29 E).

Pour conclure, on a pu déterminer à l'aide de ces expériences que $JAK2^{V617F}$ sensibilise les cellules à l'IFN α contrairement à $CALR^{del52}$ et que cet effet pourrait dépendre du niveau d'expression de la protéine STAT1 surexprimée par $JAK2^{V617F}$.

b. Effet de l'IFN α dans les lignées $JAK2^{V617F}$ et comparaison en fonction de l'expression d'EPOR et MPL

Après avoir observé la surexpression de STAT1 dans les lignées $JAK2^{V617F}$, nous avons voulu déterminer si cet effet pouvait être retrouvé en présence ou non d'un autre récepteur aux cytokines homodimérique de type 1 (EPOR) et déterminer les effets à l'état basal ou après stimulation à l'IFN α sur la phosphorylation de STAT1. Pour cela, j'ai comparé 6 lignées cellulaires, qui exprimaient soit $JAK2^{WT}$ soit $JAK2^{V617F}$ seul ou en combinaison avec EPOR ou MPL (figure 30 A).

De manière intéressante, on observe une surexpression de STAT1 uniquement dans les lignées exprimant à la fois MPL et $JAK2^{V617F}$. C'est également la seule condition où on observe une activation de STAT1 en absence de stimulation à l'IFN α . En présence d'IFN α , on observe une phosphorylation de STAT1 quelles que soient les conditions. En présence de $JAK2^{V617F}$, cette phosphorylation est augmentée par rapport aux conditions WT que les lignées expriment un récepteur homodimérique aux cytokines ou non. Cette expérience suggère que $JAK2^{V617F}$ sensibilise spécifiquement à l'IFN α de façon indépendante des récepteurs et en même temps que la combinaison $JAK2^{V617F}$ et MPL semble avoir un effet particulier en augmentant l'expression de STAT1.

Pour vérifier si la surexpression de STAT1 observée dans la lignée MPL- $JAK2^{V617F}$ est due à $JAK2^{V617F}$, j'ai traité les cellules Ba/F3 MPL- $JAK2^{WT}$ ou $JAK2^{V617F}$ avec des inhibiteurs de JAK2. J'ai analysé ensuite les effets sur l'expression de STAT1 par RT-qPCR (figure 30 B). Sans traitement par les inhibiteurs, on observe une surexpression de STAT1 dans la lignée

JAK2^{V617F} par rapport à la lignée JAK2^{WT}. Après 3H de traitement, les inhibiteurs de JAK2 n'ont pas d'effet sur les lignées WT. En revanche, dans le cas de JAK2^{V617F}, l'expression diminue fortement quel que soit l'inhibiteur de JAK2. Après 9H de traitement par les inhibiteurs, le niveau d'expression de STAT1 est comparable entre les lignées JAK2^{WT} et JAK2^{V617F}. Ces résultats montrent que la surexpression de STAT est bien due à JAK2^{V617F}.

En parallèle de ces expériences, j'ai investigué les niveaux à l'état basal d'expression d'ISG15 et USP18, qui sont des ISG induits par l'IFN α , dans les lignées JAK2^{WT} ou mutées et en présence ou non d'EPOR et MPL (figure 30 C). Les niveaux d'expressions d'USP18 et ISG15 sont comparables dans les différentes lignées exceptées dans le cas d'EPOR-JAK2^{V617F} où l'expression d'USP18 et ISG15 est diminuée mais également dans le cas de MPL-JAK2^{V617F} où l'expression de ces ISG est augmentée. Ces résultats montrent que JAK2^{V617F} en présence du récepteur MPL est capable d'induire l'expression de STAT1 mais également de certaines ISG en l'absence de stimulation à l'IFN α .

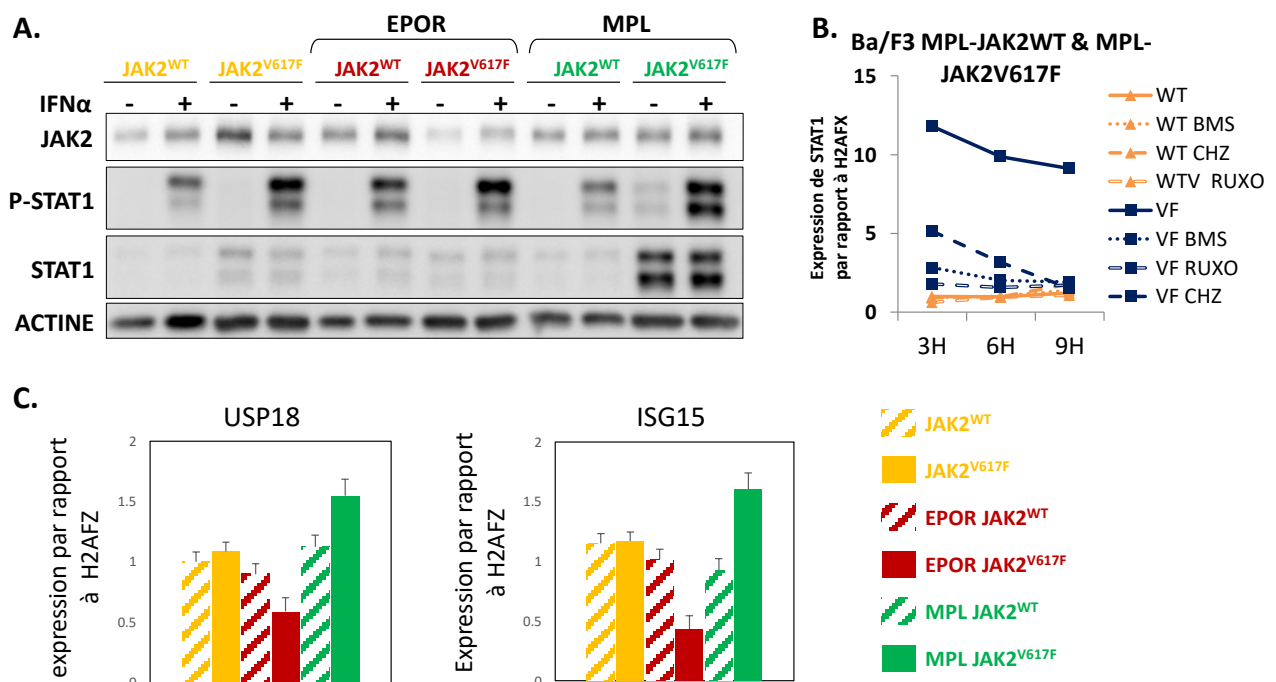


Figure 30 : Effet de l'IFN α dans les lignées JAK2^{V617F} selon l'expression ou non des récepteurs EPOR et MPL

(A) Comparaison des niveaux d'expression des protéines STAT1 totale et P-STAT1 dans les lignées JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} en présence ou non des récepteurs EPOR ou MPL avant et après 15 de stimulation à l'IFN α (n=1). (B) Effet des inhibiteurs de type 1 (Ruxolitinib à 1000nM et BMS91143 à 1000nM) ou de type 2 (CHZ868 à 100nM) sur l'expression de STAT1 dans les lignées MPL-JAK2^{WT} (WT) et JAK2^{V617F} (VF) (n=1). (C) Effet de l'IFN α sur l'expression des ISG sans traitement à l'IFN α dans les lignées exprimant JAK2^{WT} ou JAK2^{V617F} ainsi que MPL ou EPOR (n=1).

Pour conclure, j'ai pu déterminer que JAK2^{V617F} est capable de sensibiliser à l'IFN α et qu'en présence de MPL, il semble avoir un effet particulier en induisant l'expression de certains ISG en l'absence de stimulation à l'IFN α .

c. Effet de l'IFN α sur les cellules dérivées de progéniteurs d'un patient muté JAK2^{V617F} en comparaison d'un sujet sain

Pour confirmer les effets de l'IFN α sur les niveaux d'expression de STAT1 et son activation observée dans les lignées JAK2^{V617F} chez l'Homme, j'ai réalisé une expérience de stimulation à l'IFN α des cellules dérivées de progéniteurs en comparaison à un sujet sain obtenu par cytophérèse (figure 31).

Dans cette expérience, on retrouve des résultats similaires qui ont été observés dans les lignées Ba/F3. En d'autres termes, on observe une surexpression de STAT1 dans le cas du patient par rapport au sujet contrôle (figure 31 A). On observe une augmentation de l'activation de STAT1 dans le cas du patient qui est dose dépendante. Par ailleurs, l'expression des ISG (IFIT1 et MX1) induite par le traitement à l'IFN α est augmentée dans les cellules primaires du patient par rapport au contrôle et ce, de manière dose dépendante (figure 31 B).

Ces résultats obtenus par western blot et par RT-qPCR à partir de cellules de patient, bien que cela soit des résultats préliminaires, confortent les résultats obtenus dans les lignées cellulaires et démontrent que JAK2^{V617F} sensibilise les cellules primaires de patients à l'IFN α in vitro.

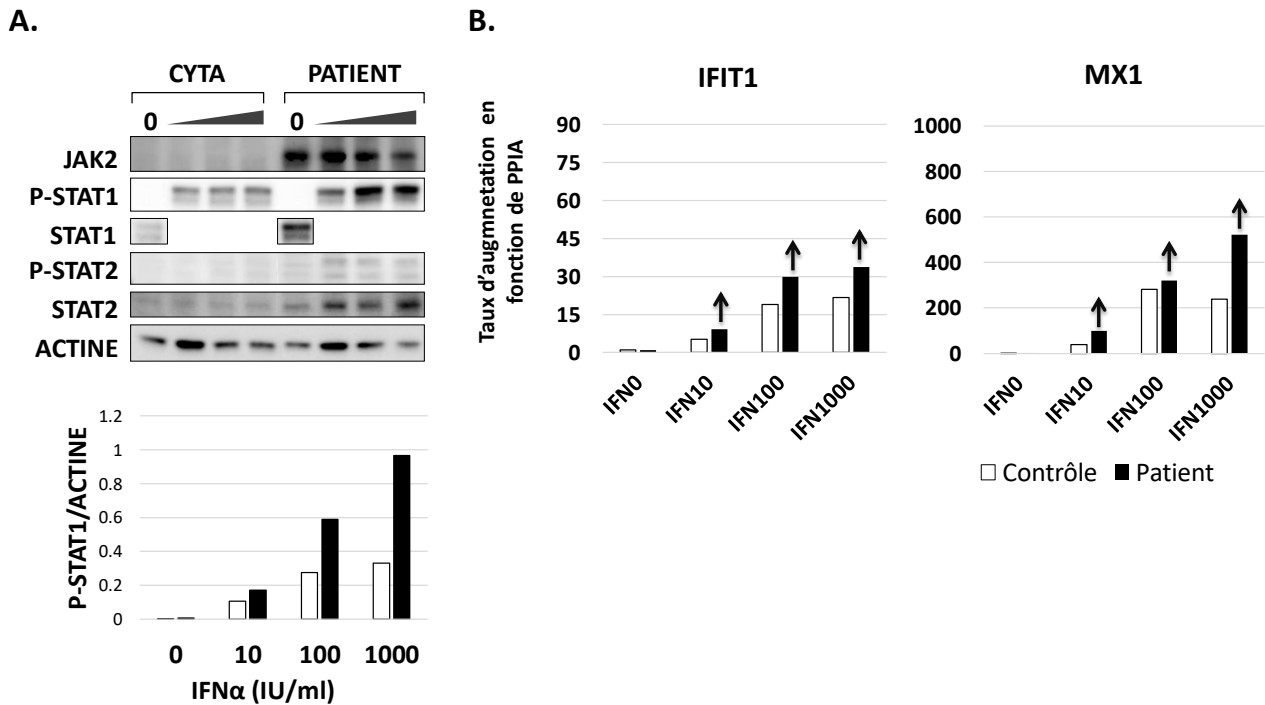


Figure 31 : Effet de l'IFN α sur des cellules primaires d'un patient JAK2^{V617F} et d'un sujet sain

Effet de l'IFN α *in vitro* sur des cellules issues de progéniteurs CD34⁺ après 5 jours de cultures cellulaires provenant d'un patient en MFP exprimant JAK2^{V617F} en comparaison à un sujet contrôlé. (A) Effet dose de l'IFN α (0, 10, 100 ou 1000 UI/ml d'IFN α humain) sur l'expression des protéines STAT 1 et 2 totales ou phosphorylées par WB (haut) et quantification de P-STAT1/ACTINE (bas). (B) Effet dose de l'IFN α sur les ISG.

d. Analyses transcriptomiques : comparaison entre patients JAK2^{V617F} et contrôles

Pour comparer les cellules issues de CD34⁺ provenant de patients JAK2^{V617F} et de sujets sains, nous avons réalisé une expérience de RNAseq afin de comparer le transcriptome des cellules avec et sans traitement à l'IFN α . Une analyse différentielle a ensuite été effectuée pour comparer les gènes exprimés avec et sans traitement à l'IFN α chez les contrôles et chez les patients. Nous avons également comparé les données chez les contrôles et les patients sans traitement. Ces trois analyses ont ensuite été recoupées pour déterminer si des gènes étaient communément ou spécifiquement exprimés sous IFN α (figure 32 A).

De cette façon, nous avons déterminé que 2393 gènes sont différentiellement exprimés après traitement par l'IFN α dans les contrôles. Dans le cas des patients, seulement 473 gènes sont différentiellement exprimés par l'IFN α . De manière intéressante, 1943 gènes sont différentiellement exprimés entre les patients et les contrôles à l'état basal. Parmi eux, 492 gènes sont induits communément chez les patients sans IFN α et chez les contrôles sous

IFN α . Une analyse de voies a permis de montrer que ces gènes sont impliqués principalement dans la réponse à l'IFN α et IFN γ ainsi que la voie P53 (figure 32B).

Ces résultats montrent que JAK2^{V617F} induit à l'état basal des gènes activés par l'IFN α chez les contrôles et que l'IFN α induit plus de gènes chez les contrôles que chez les patients JAK2^{V617F} traités *in vitro*.

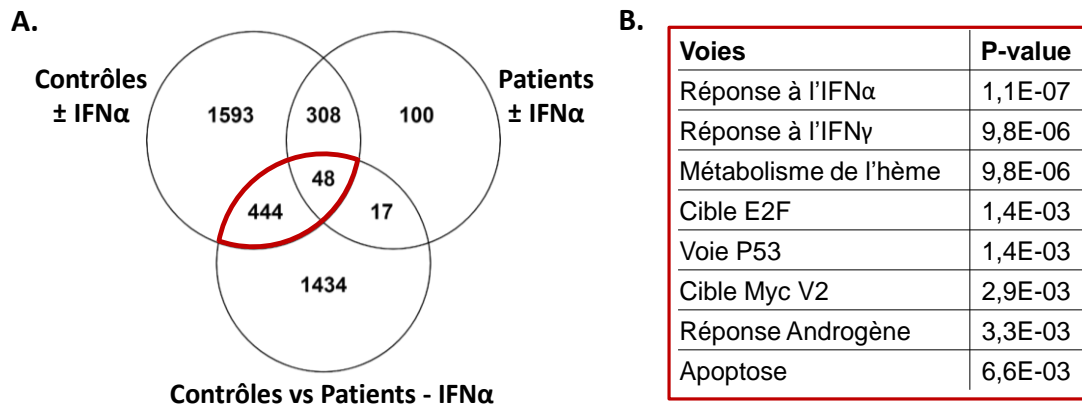


Figure 32 : Analyses transcriptomiques de progéniteurs CD34⁺ de patients JAK2^{V617F} et de contrôles sous IFN α

(A) Comparaison des gènes différentiellement exprimés \pm IFN α dans les progéniteurs CD34⁺ de contrôles (en haut à gauche), de patients (en haut à droite) ou différentiellement exprimés entre les progéniteurs CD34⁺ de contrôles et de patients JAK2^{V617F} (en bas). (B) Voies induites dans les CD34⁺ de patients JAK2^{V617F} et induites sous IFN α dans les CD34⁺ de contrôles (entouré en rouge dans la figure A).

En étudiant l'effet de l'IFN α sur la signalisation, nous avons observé que JAK2^{V617F} contrairement à CALR^{del52} sensibilise à l'IFN α de façon dose dépendante mais également au cours du temps dans les lignées Ba/F3. La principale différence entre les lignées est que la protéine STAT1 est surexprimée en contexte JAK2^{V617F} par rapport à JAK2^{WT} mais également par rapport à CALR^m. Bien que ces résultats doivent être confirmés, la surexpression de STAT1 est observée uniquement dans les lignées MPL-JAK2^{V617F} et n'est pas retrouvée dans les lignées EPOR-JAK2^{V617F} ou JAK2^{V617F} seul. Ces résultats suggèrent un effet spécifique de l'association MPL-JAK2^{V617F}. Par ailleurs, dans cette lignée, on a pu voir une augmentation de l'expression de certains ISG en l'absence de traitement à l'IFN α ce qui montre que la voie de l'IFN α est pré-activée. On a pu constater que les cellules issues de progéniteurs CD34⁺ d'un patient JAK2^{V617F} homozygote étaient plus sensibles au traitement à l'IFN α par rapport aux cellules issues d'un contrôle en induisant une phosphorylation plus importante de STAT1 sous IFN α , une augmentation de l'expression des ISG ainsi qu'une surexpression de STAT1. Enfin, à travers une analyse transcriptomique, on a pu montrer que des gènes activés par l'IFN α dans les CD34⁺ de contrôles étaient induits par JAK2^{V617F}.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'objectif de ma thèse a été d'apporter des éléments dans la compréhension du mécanisme d'action de l'IFN α dans le traitement des NMP. Toutes les données que nous avons obtenues apportent des éléments dans l'impact du traitement à l'IFN α chez les patients et la compréhension de son mécanisme de signalisation. Cependant, de nombreux éléments sont encore à explorer.

Premièrement, nous souhaitons améliorer le modèle mathématique notamment en prenant en compte plus de paramètres ainsi que l'étude de nouveaux patients pour mieux prédire la réponse à long-terme et les doses à administrer. Nous pensons que comprendre l'effet de l'IFN α sur l'hématopoïèse normale et mutée (par exemple le taux de division des CSH WT et mutées) permettra des améliorations du modèle et donc l'optimisation du traitement des patients. La compréhension du rôle des mutations associées sur les paramètres du modèle est également cruciale puisqu'elles peuvent entraîner des effets variables sur la réponse à l'IFN α chez les patients.

Deuxièmement, le mécanisme de signalisation doit être mieux décortiqué. En effet, le traitement à l'IFN α a montré une certaine efficacité chez les patients JAK2^{V617F} contrairement à CALR^m. Les données actuelles mettent en évidence que STAT1 est un élément clé dans la sensibilisation des cellules mutées JAK2^{V617F} à l'IFN α . Étudier les différences mécanistiques dans un contexte JAK2^{V617F} et CALR^m est également important pour mieux comprendre son mécanisme.

Troisièmement, grâce aux études de signalisation ou indépendamment, une autre voie d'amélioration de cette thérapie pourrait être de combiner l'IFN α avec d'autres molécules telles que le Ruxolitinib ou encore l'arsenic.

I. AMÉLIORATION DU MODÈLE MATHÉMATIQUE

L'étude que nous avons menée pendant 5 ans sur la cohorte de patients traités à l'IFN α nous a permis de stratifier les patients vis-à-vis de cette thérapie en fonction des mutations JAK2^{V617F} homozygotes ou hétérozygotes ainsi qu'en fonction des mutations CALR^m. Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la dose d'IFN α a un impact chez les patients qui diffère selon la mutation motrice ce qui suggère des différences de mécanisme d'action de l'IFN α selon les mutations motrices.

Afin d'améliorer le taux de réponse chez les patients, il est important de pouvoir mieux comprendre comment l'IFN α agit en fonction des doses administrées et également quels patients ont le plus de chance de répondre ou non au traitement. Au sein de cette cohorte nous avons pu observer des différences de posologie d'un patient à l'autre. On observe parfois pour une période donnée la même quantité d'IFN α administrée mais de manière différente (par exemple une dose de 135 μ g toutes les deux semaines ou bien 67.5 μ g toutes les semaines). Le traitement est également parfois modifié au cours du temps. De plus le traitement est administré selon la réponse hématologique et la tolérabilité et ne prend pas en compte la réponse moléculaire. L'IFN α est un traitement qui est utilisé sans directive claire ni certitude de guérison d'un patient donné. La prédiction à long-terme de réponse au traitement en prenant en compte différents paramètres tel que la posologie pourrait permettre d'être mieux adapté à chaque patient.

Ces derniers mois, l'équipe de PH. Cournède avec qui nous collaborons est allée plus loin dans le développement du modèle mathématique. Pour cela, ils ont appliqué une procédure de sélection de modèles et utilisé une méthode d'inférence bayésienne hiérarchique pour déchiffrer comment les variations de doses ont un impact sur la réponse thérapeutique. Il a été constaté que le traitement peut induire une rémission à long-terme lorsqu'une dose suffisante (dépendante de chaque patient) est atteinte. Ils ont aussi déterminé une dose minimale pour chaque individu de la cohorte de patients pour induire une réponse moléculaire et estimer la dose initiale la plus appropriée à administrer à un nouveau patient pour augmenter ses chances de guérison (Hermange et al. 2021). Ainsi cette étude suggère qu'on pourrait adapter la dose de façon personnalisée pour chaque patient en vue d'une réponse moléculaire tout en prenant en compte la tolérabilité de chaque patient.

Pour aller plus loin dans la prédiction de l'effet du traitement, une cohorte de validation de patients traités est en cours d'élaboration et d'étude. Les dynamiques des CSH mutées à l'arrêt du traitement pour certains patients sont également étudiées et analysées ; ce qui pourrait permettre de savoir quand arrêter le traitement.

À terme, l'équipe souhaite développer une application pour l'aide au choix des doses et pouvoir corrélérer le temps de réponse moléculaire pour chaque patient.

II. MODÉLISATION MULTI-ÉCHELLES DE L'HÉMATOPOÏÈSE

Au laboratoire, un projet en collaboration avec deux autres équipes spécialisées en hématopoïèse normale (Leïla Périé, Institut Curie) et en mathématiques appliquées (Paul-Henry Cournède, CentraleSupélec) a pour objectif de modéliser à plusieurs échelles l'hématopoïèse (à court-terme et à long-terme) dans le but d'optimiser le traitement des NMP par IFN α .

À court-terme, l'hématopoïèse peut être considérée comme un processus de prolifération et de différenciation où une quantité importante de cellules fonctionnelles différentes naissent à partir d'une CSH unique. Dans cette optique, nous voulons effectuer 3 analyses sur différents types de progéniteurs en nous basant sur plusieurs essais dont 2 qui sont développés par l'équipe de Leïla Périé.

Première approche : test multigen

Ce test sera effectué sur trois types de progéniteurs (enrichis en CSH, immatures et engagées) obtenus à partir de sang de patients avant et après 3 mois de traitement à l'IFN α . Les progéniteurs seront marqués à l'aide de colorant qui permet de suivre les divisions cellulaires au cours du temps (CFSE, CTV) (Tak et al. 2021). Ils sont ensuite triés à l'échelon unicellulaire pour chaque couleur utilisée et 4 progéniteurs de différentes couleurs sont cultivés ensemble en présence de cytokines (SCF, TPO, EPO, IL6, GM-CSF et FLT3) pendant 96 heures. Les cellules issues des progéniteurs sont ensuite caractérisées par cytométrie en flux pour déterminer le nombre de divisions effectuées et leur phénotype de différenciation à l'aide d'anticorps. Ce test nous communiquera des informations sur la relation entre division et différenciation pour les différents compartiments de progéniteurs.

Deuxième approche : expériences Incucyte

De la même manière que pour les expériences multigénérationnelles, les trois types de progéniteurs issus de patients traités avant et après 3 mois à l'IFN α sont mis en culture à l'échelon unicellulaire en présence de cytokines pendant 14 jours. Pendant les 96 premières heures de culture, les cellules sont placées dans un appareil incucyte (imagerie en temps réel) qui permet de prendre une photo toutes les heures de chaque puits. De cette façon, on peut déterminer le temps de première et seconde division pour chaque progéniteur. Au bout de 14 jours, chaque puits est divisé en 2 parties. Une partie est génotypée pour déterminer

le statut mutationnel du progéniteur de départ pour la mutation JAK2^{V617F} ou CALR^m. L'autre partie est analysée par cytométrie en flux pour déterminer le phénotype de différenciation en termes de progéniteurs, mégacaryocytes, cellules érythroïdes et granulocytes. Ce test permet d'avoir des informations sur le taux de division et le profil de différenciation des progéniteurs en fonction du génotype.

Nous utiliserons les deux tests pour caractériser le changement de la dynamique cellulaire à court-terme avant et après IFN α . Le taux de division cellulaire et la relation entre la division et la différenciation pour les différents progéniteurs mutés ou non seront utilisés pour calibrer un modèle d'hématopoïèse à court-terme et par la suite pour paramétrer le modèle de réponse à l'IFN α sur le long-terme.

De cette façon nous voulons explorer si l'IFN α est capable d'augmenter le cycle cellulaire et la différenciation des CSH JAK2^{V617F}, comme le prédit le modèle que nous avons déjà établi (Mosca et al. 2021). Nous avons commencé à générer des données préliminaires sur plusieurs patients avant traitement à l'IFN α démontrant que les progéniteurs enrichis en CSH se divisent de la même manière, qu'elles soient mutées ou non pour JAK2^{V617F}.

Troisième approche : scRNA-seq

Les données obtenues par multigen et incucyte sont des effets observés *in vitro* sur les progéniteurs et CSH. Une troisième approche visera à caractériser l'effet de l'IFN α sur les CSH et progéniteurs en effectuant un scRNA-seq à partir de cellules CD34⁺ de patients traités par l'IFN α *in vivo*. L'analyse transcriptomique à l'échelon unicellulaire sera couplée à la détection des mutations pour pouvoir analyser les trajectoires hématopoïétiques des cellules WT et mutées au sein d'un même individu, comme cela a déjà été fait précédemment (Van Egeren et al. 2021). Par exemple, nous saurons quelles populations de CSH et progéniteurs sont impactées par l'IFN α dans un contexte JAK2^{V617F} ou CALR^m ce qui permettra d'apporter des éléments sur la régulation de l'hématopoïèse. Enfin le séquençage ARN permettra également de déterminer la ou les voies impliquées dans le mécanisme d'action de l'IFN α dans la population d'intérêt. Ainsi, cela nous permettra de confirmer ou non les prédictions du modèle mathématique qui indique que l'IFN α induit la sortie de quiescence et la mise en différenciation des CSH JAK2^{V617F} hétérozygotes et homozygotes en accord avec ce qui est trouvé avec les cellules normales mais également les cellules JAK2^{V617F} dans les modèles murins (Essers et al. 2009; Walter et al. 2015; Mullally et al. 2013).

Cependant, nos données ne sont pas en accord avec l'étude de Tong et *al.* qui montre que l'IFN α induit l'apoptose des cellules JAK2^{V617F} hétérozygotes tandis que l'IFN α induit un programme de quiescence des cellules JAK2^{V617F} homozygotes (Tong et al. 2021).

Avec notre premier modèle mathématique, nous avons inféré que l'IFN α cible préférentiellement les cellules homozygotes et à haute dose, mais le mécanisme d'action *in vivo* est encore mal compris, principalement parce qu'il impacte les paramètres des CSH qui ne sont pas mesurés directement. En combinant toutes ces nouvelles données sur les paramètres des CSH, nous visons donc à améliorer les paramètres du modèle à partir des données expérimentales. Cela nous permettra de tester différentes hypothèses sur l'action de l'IFN α (par exemple le ciblage de l'IFN α sur les CSH WT, l'effet dose dépendant de l'IFN α) et de sélectionner la plus probable en fonction des données.

Enfin, l'amélioration du modèle passe également par la prise en compte de paramètres comme celui de l'impact des mutations associées. Comme le modèle mathématique prend déjà en compte les cellules hétérozygotes et homozygotes, on peut également étendre le modèle mathématique pour tenir compte des cellules avec ou sans mutations associées.

III. ÉTUDES DES MUTATIONS ASSOCIÉES ET INFLUENCES SUR LE TRAITEMENT À L'IFNA

Les mutations que nous avons étudiées sont des mutations qui surviennent dans des gènes fréquemment mutés chez les patients atteints de NMP et qui peuvent modifier la progression de la maladie. Une des questions qui subsiste est de savoir si le traitement à l'IFN α peut favoriser l'expansion de ces mutations et s'il faut traiter les patients qui portent ces mutations ou non.

Nous nous sommes intéressés aux mutations associées qui pouvaient être potentiellement sélectionnées par l'IFN α . Pour cela nous nous sommes concentrés sur les mutations associées dont la charge allélique était stable, augmentait ou apparaissait au cours du suivi des patients sous IFN α . Nous avons observé dans le cas de deux patients mutés CALR^m que les mutations associées (TP53^{V143M} et TET2^{S315fs}) étaient retrouvées exclusivement dans les clones CALR^m. Par conséquent, l'apparition des mutations associées était un évènement secondaire. Contrairement aux patients CALR^m, les mutations de *DNMT3A* et *TET2* présentes au sein des 3 patients mutés JAK2^{V617F} ou MPL^{W515K} que nous avons étudiés ont été retrouvées dans des clones indépendants. Les mutations de *DNMT3A* et de *TET2* n'ont pas

été ciblées par l'IFN α . Dans le cas des patients JAK2^{V617F} et MPL^{W515K}, l'IFN α cible les clones portant la mutation motrice ce qui pourrait permettre de démasquer d'autres clones résistants à l'IFN α et qui prennent plus ou moins l'avantage sur les clones WT (TET2^{H193fs} > DNMT3A^{mut}). Alternativement, ceci pourrait suggérer que l'IFN α induit le rétablissement d'une hématopoïèse polyclonale

Pour plusieurs patients, nous avons observé une différence d'évolution et d'avantage selon le type de progéniteurs, en particulier les progéniteurs CD90⁺ et CD90⁻ qui sont très différents, sans doute parce que les progéniteurs CD90⁻ sont biaisés vers la lignée lymphoïde. Les CD90⁺ sont plus impactés par les mutations associées ce qui montre leur origine et avantage dans le compartiment des CSH.

Mutation TP53

Dans le cas du patient muté pour CALR^{del34}, on a pu déterminer qu'au cours du traitement la mutation de TP53 augmente et que les doubles mutants sont majoritaires à la fin du traitement. On a pu observer notamment chez ce patient une accélération de l'augmentation de la charge allélique de TP53^{V143M} avec une prise d'avantage des doubles mutants homozygotes pour TP53^{V143M}.

Il est important de savoir si l'IFN α est capable de sélectionner ou d'accélérer la sélection des clones TP53 mutés hétérozygotes ou homozygotes ou si l'évolution de ce clone est indépendante du traitement. En effet l'IFN α peut induire la voie P53 (Porta et al. 2005) ce qui pourrait contre-sélectionner les clones TP53 mutés préexistants. De plus, des essais cliniques de l'IFN α en combinaison avec l'Idasanutlin (antagoniste de MDM2) ont montré des réponses hématologiques et moléculaires très intéressantes (Mascarenhas et al. 2019). Cependant, comme le traitement des cellules par un inhibiteur de MDM2 (régulateur négatif de TP53) sélectionne aussi les cellules mutées pour TP53 provenant de patients NMP (Maslah et al. 2022), il est légitime de se poser la question du traitement des patients portant ces mutations par ces thérapies.

Il est donc possible que le traitement à l'IFN α chez un patient qui porte une mutation de TP53 donne un avantage aux cellules mutées et potentiellement favorise l'évolution de la maladie. Néanmoins, les modèles de souris montrent que la perte fonctionnelle des deux allèles WT pour TP53 conduit à une transformation leucémique sans traitement (Rampal et al. 2014; Tsuruta-Kishino et al. 2017).

Au total, nous pouvons émettre deux hypothèses : i) l'expansion du clone homozygote pour TP53^{V143M} que nous avons déterminé au cours du suivi du patient #40 pourrait être due à l'évolution naturelle de ce clone ou ii) le traitement à l'IFN α a permis d'accélérer son évolution dans la mesure où le clone CALR n'était pas ciblé.

Deux ans après l'arrêt du traitement, ce patient a montré une augmentation de la charge allélique de TP53 à 32% par NGS ainsi que plusieurs anomalies caryotypiques (Del5q, 13q-, 14q-, trisomie 1q ainsi qu'une translocation t(X ; 12)) qui ont amenés ce patient à subir une greffe allogénique de moelle.

Bien que nous ayons étudié qu'un seul patient portant une mutation de TP53, nos résultats ainsi que les données de la littérature suggèrent que la détection de mutation de TP53 chez les patients NMP doit être prise en compte dans le traitement de ces patients à l'IFN α .

Mutations TET2

L'IFN α ne semble pas cibler le clone muté pour TET2 que ce soit dans le cas du patient CALR^m et du patient JAK2^{V617F} que nous avons étudiés. La mutation de TET2 ne semble pas donner d'avantage au clone CALR^{del52}. En revanche, dans le cas de JAK2^{V617F}, on a pu observer que le simple mutant TET2 a envahi complètement le compartiment le plus immature. Chez ce patient, le traitement à l'IFN α cible les cellules mutées pour JAK2^{V617F} ce qui permet au clone TET2 de repeupler ce compartiment probablement en ayant un avantage compétitif sur le clone WT. De manière intéressante, on a pu voir que ce patient avait eu plusieurs modifications du traitement au cours du temps qui concorde avec des modifications dans la dynamique d'expansion des clones JAK2^{V617F} et TET2^{H193fs}. Cette observation montre qu'il peut être effectivement important de prendre en compte les modifications de posologie chez les patients.

Mutations DNMT3A

Au cours du traitement à l'IFN α , nous avons observé l'apparition de mutations *DNMT3A* chez 3 patients. Les mutations de *DNMT3A* et de *JAK2* ou *MPL* sont mutuellement exclusives pour les deux patients que nous avons pu étudier. Comme ces mutations sont retrouvées uniquement dans des clones séparés, il est probable que ces mutations soit survenues de façon indépendante comme cela a été observée dans la littérature grâce à des études de séquençage d'exomes à l'échelon clonal (Nangalia et al. 2015).

La charge allélique de ces mutations augmente de façon lente au cours du temps tandis que les clones portant les mutations motrices $JAK2^{V617F}$ ou MPL^{W515K} sont ciblés par l'IFN α comme observé dans une étude récente (Knudsen et al. 2022). Cette étude montre que les mutations de *DNMT3A* apparaissent plus fréquemment chez les patients traités à l'IFN α par rapport à ceux traités par HU. Il est possible que comme l'IFN α cible les cellules $JAK2^{V617F}$, il favorise l'émergence de clones *DNMT3A* de façon indirecte car ces clones sont résistants à l'IFN α . Par ailleurs, l'apparition et la progression des clones mutés pour *DNMT3A* ont été montrées comme similaire entre des patients traités ou non à l'IFN α pour lesquelles la mutation de $JAK2^{V617F}$ ou de *MPL* diminue au cours du temps (Nangalia et al. 2015). Par conséquent, l'apparition des mutations de *DNMT3A* au cours du traitement à l'IFN α pourrait témoigner du fait que le traitement permet de rétablir une hématopoïèse polyclonale de clones résistants à l'IFN α .

IV. EFFET DE $JAK2^{V617F}$ ET $CALR^m$ SUR LA SIGNALISATION À L'IFN α

Nous avons aussi étudié l'effet de l'IFN α *in vitro* sur la signalisation dans un contexte $JAK2^{V617F}$ ou $CALR^{del52}$. Nous avons montré par WB que $JAK2^{V617F}$ sensibilise les cellules Ba/F3 au traitement à l'IFN α contrairement à ce qu'on a pu observer dans le cas de $CALR^m$. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent également que l'effet de l'IFN α dans les cellules $JAK2^{V617F}$ passe par STAT1 (Czech et al. 2019). En revanche, dans le cas de la $CALR^m$, on observe une phosphorylation de STAT1 à l'état basal. L'activation de la protéine STAT1 par phosphorylation ne semble donc pas suffisante pour expliquer les différences entre $JAK2^{V617F}$ et $CALR^m$. Par ailleurs ces effets sont observés à des temps court de traitement à l'IFN α et à forte dose.

Dans la littérature, il a été montré dans certains contextes que les STAT non phosphorylées étaient capables d'induire l'expression de certains ISG et pouvaient notamment prolonger la signalisation à l'IFN α à plus long-terme (Cheon et Stark 2009). Dans nos lignées cellulaires nous avons observé que STAT1 totale était surexprimée dans les lignées $JAK2^{V617F}$ contrairement aux lignées $CALR^{del52}$ et que cette surexpression était spécifique des lignées exprimant le récepteur *MPL*. Ces résultats sont d'autant plus intéressants sachant que dans la littérature, il a été montré que l'IFN α ciblerait les CSH $CD41^{high}$ biaisées vers la lignée

mégacaryocytaire, qui est régie par la TPO et son récepteur MPL (Rao et al. 2021; Tong et al. 2021).

De plus, Czech *et al.* montrent que l'amorçage de la voie de l'IFN α était dépendant de la phosphorylation de STAT1 et que sa surexpression dans les lignées CALR permet d'augmenter l'effet de l'IFN α dans ces cellules (Czech et al. 2019).

Par ailleurs, nous avons observé à plusieurs reprises dans les lignées JAK2^{V617F} une augmentation de l'expression non seulement de l'isoforme α mais aussi de l'isoforme β de STAT1. STAT1- β est une forme plus courte de STAT1 issue de l'épissage alternatif qui ne porte pas le domaine d'activation de la transcription TAD (*transcription activated domain*). De ce fait, il a été postulé comme étant un dominant négatif de STAT1- α . Notamment, la surexpression de STAT1- β dans des lignées cellulaires de lymphocytes B inhibe l'activité de STAT1- α , sa fixation à l'ADN ainsi que la transcription de gènes induits par STAT1 (Baran-Marszak 2004). Dans ces lignées, les auteurs ont montré que STAT1- α a un effet antiprolifératif/proapoptotique en réponse à l'IFN γ . De plus, l'activation de P53 en réponse aux dommages à l'ADN dans ces lignées est inhibée par l'expression de STAT1- β qui favorise la prolifération cellulaire. Leurs résultats montrent que le déséquilibre entre l'isoforme STAT1- α et l'isoforme prolifératif STAT1- β est susceptible de jouer un rôle crucial dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose. Pour montrer que STAT1 est un élément crucial de la réponse à l'IFN α et également mieux comprendre les effets *in vivo*, il serait intéressant de réaliser des expériences sur un modèle de souris qui surexprime STAT1 (STAT1 totale, STAT1- α ou STAT1- β ou encore STAT1^{Y710F} qui est non phosphorylable). La surexpression de STAT1 pourrait être étudiée en particulier dans un modèle de souris CALR^{del52} traité ou non à l'IFN α pour voir si les souris répondent mieux au traitement et quels sont les effets observés sur l'apoptose, le cycle cellulaire, la sénescence ou bien encore les niveaux de ROS.

V. ÉTUDE DES COMBINAISONS DE TRAITEMENT À L'IFN α

Dans la première partie, nous avons essayé d'améliorer le mode de traitement à l'IFN α mais un autre objectif est de le combiner à d'autres molécules pour le rendre plus efficace. Le Ruxolitinib est déjà utilisé dans les traitements de MFP et montre des effets positifs sur les symptômes chez ces patients tout comme de fédératinib. L'utilisation du Ruxolitinib avec l'IFN α semble toutefois contre intuitive puisque le Ruxolitinib inhibe JAK2 mais aussi JAK1 qui est impliquée dans la voie médiée par l'IFN α . Toutefois, une étude chez la souris a montré que l'IFN α aurait un effet sur les CSH mutées tandis que le Ruxolitinib aurait un effet préférentiel sur les progéniteurs (Austin et al. 2020). Cette étude explique d'une part pourquoi l'inhibiteur de JAK2 ne cible pas les clones malins et d'autre part apporte une information qui souligne un mécanisme pour l'utilisation de ces deux traitements chez les patients.

Le Pr. Jean-Jacques Kiladjian avec qui nous collaborons mène un essai préclinique de phase 1-2 pour tester les effets de la combinaison IFN + Ruxolitinib (RUXOPEG) chez des patients atteints de MFP. Cette étude vise à évaluer chez les patients n'ayant jamais reçu d'IFN α l'efficacité et l'innocuité de différentes combinaisons de doses Ruxolitinib + IFN α . Les patients ont montré une diminution de la taille de la rate dans 70% des cas ainsi qu'une diminution de la charge allélique des mutations dans le sang durant la première année de suivi. Nous avons investigué l'architecture clonale des progéniteurs avant et après 1 an de traitement et avons noté une diminution de la proportion des clones homozygotes ou hétérozygotes dans plus de la moitié des patients (7/11 patients) (figure 33).

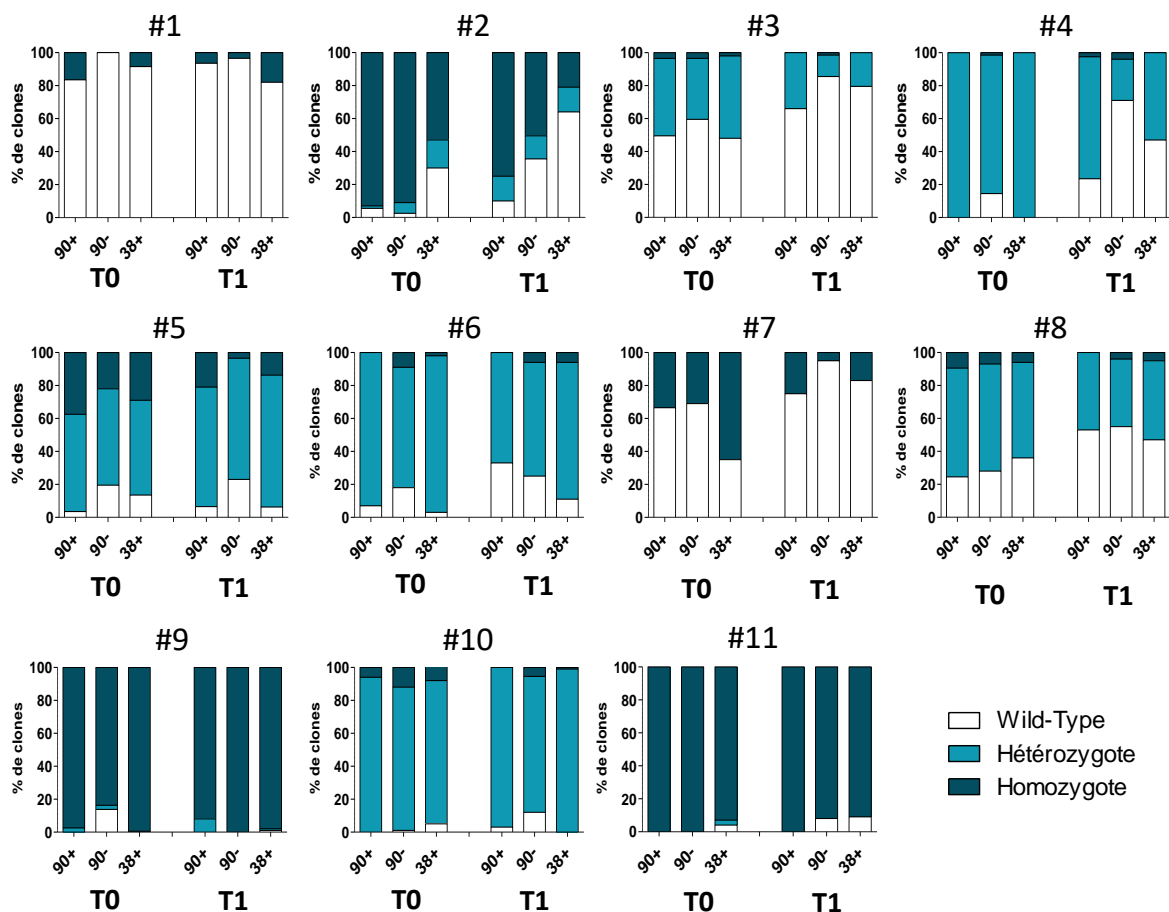


Figure 33 : Suivi du statut mutationnel des progéniteurs de patients traités à l'IFN + Ruxolitinib

Étude de la proportion de clones mutés pour $JAK2^{V617F}$ (patient #1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 et 11) ou $CALR^{del52}$ (patient #6) avant (T0) ou après un an (T1) de traitement à l'IFN α + Ruxolitinib de patients atteints de MFP. La proportion de clone pour chaque temps donné est représentée dans les progéniteurs enrichis en CSH (90 $^+$), immatures (90 $^-$) et engagés (38 $^+$).

D'autres pistes de combinaisons de traitements ont été évaluées pour augmenter les effets de l'IFN α , notamment en combinaison avec l'Idasanutlin (voir plus haut). De plus, une étude préclinique réalisée au laboratoire a montré que l'IFN α combinée à l'arsenic trioxyde (ATO) avait des effets spectaculaires sur le ciblage des CSH $JAK2^{V617F}$ (Dagher et al. 2021).

PML fait partie de la super famille des TRIM qui sont des ubiquitines ou SUMO ligases. La transcription du gène PML est induite notamment par la signalisation à l'IFN α . PML *via* la formation des corps nucléaires est capable d'entraîner l'arrêt de la croissance des cellules conduisant à la senescence. L'arsenic est une molécule qui agit directement sur PML et augmente l'activité des corps nucléaires en induisant l'oxydation de PML et sa multimérisation.

Le laboratoire en collaboration avec le Pr. Jean-Jacques Kiladjian et le Pr. Hugues de Thé a montré que la combinaison ATO + IFN α potentialise le ciblage des cellules JAK2^{V617F} par rapport à l'IFN α seul. Cette combinaison cible des progéniteurs JAK2^{V617F} de patients traités *in vitro* mais également élimine les CSH JAK2^{V617F} dans un modèle de souris chimériques. De manière intéressante mais préliminaire, l'étude de l'effet du traitement à l'IFN α + ATO sur un modèle de souris CALR^{del52} traité à l'IFN α + ATO mené au laboratoire ne montre pas d'effet supérieur par rapport au traitement à l'IFN α seul contrairement à ce qu'il a pu être observé dans le cas de la mutation JAK2^{V617F}.

Ces données mettent probablement en avant des différences au niveau du mécanisme entre JAK2^{V617F} et CALR^{del52}. Ceci pourrait être dû au fait que l'IFN α sensibilise les cellules JAK2^{V617F} contrairement aux cellules CALR^m (voir résultats partie III) (Czech et al. 2019).

Par ailleurs, l'étude des souris KI JAK2^{V617F} menée au laboratoire a permis de montrer que l'expression de JAK2^{V617F} augmente l'expression de PML qui est d'autant plus importante après traitement à l'IFN α *in vitro* dans les progéniteurs (LK de souris KI JAK2^{V617F}). Par ailleurs, le traitement par l'ATO induit une augmentation de la sumoylation de PML et la formation des corps nucléaires (Dagher et al. 2021). Il serait donc intéressant d'étudier les effets de l'IFN \pm ATO sur l'expression et la sumoylation de la protéine PML dans les progéniteurs de souris mutés CALR^{del52} et les comparer à JAK2^{V617F}.

ANNEXES

Annexe n°1

El-Khoury M, Cabagnols X, Mosca M, Vertenoil G, Marzac C, Favale F, Bluteau O, Lorre F, Tisserand A, Rabadan Moraes G, Ugo V, Ianotto JC, Rey J, Solary E, Roy L, Rameau P, Debili N, Pasquier F, Casadevall N, Marty C, Constantinescu SN, Raslova H, Vainchenker W, Plo I. ***Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. Oncogene. 2020 Jul;39(31):5323-5337. doi: 10.1038/s41388-020-1368-3. Epub 2020 Jun 22. PMID: 32572159.***

Contribution personnelle : Dans cette étude j'ai participé à la purification des échantillons de sang de certains patients.

Annexe n°2

Murakami S, Barroca V, Perié L, Bravard A, Bernardino-Sgherri J, Tisserand A, Devanand C, Edmond V, Magniez A, Tenreira Bento S, Torres C, Pasquier F, Plo I, Vainchenker W, Villeval JL, Roméo PH, Lewandowski D. ***In Vivo Monitoring of Polycythemia Vera Development Reveals Carbonic Anhydrase 1 as a Potent Therapeutic Target. Blood Cancer Discov. 2022 Jul 6;3(4):285-297. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0039. PMID: 35290450.***

Contribution personnelle : Dans cet article, j'ai participé à la purification des CD34⁺ de tous les prélèvements de sang de patients, au génotypage des colonies de BFU-E, et j'ai effectué le RNA-seq dans les progéniteurs.

Annexe n°3

Gurvan Hermange, Alicia Rakotonirainy, Mahmoud Bentriou, Amandine Tisserand, Mira El-Khoury, François Girodon, Christophe Marzac, William Vainchenker, Isabelle Plo, Paul-Henry Cournède. ***Inferring the initiation and development of myeloproliferative neoplasms. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022 Sep 13;119(37):e2120374119. doi: 10.1073/pnas.2120374119. Epub 2022 Sep 9. PMID: 36083966; PMCID: PMC9478641.***

Contribution personnelle : J'ai participé à l'extraction des cellules d'intérêts et au génotypage de certains patients JAK2^{V617F}. J'ai également réalisé les schémas qui illustrent le modèle.

Annexe n°4

Christian Pecquet*, Thomas Balligand*, Ilyas Chachoua*, Amandine Tisserand*, Nicolas Papadopoulos, Gaëlle Vertenoel, Anita Roy, Caroline Marty, Harini Nivarthi, Jean-Philippe Defour, Mira El-Khoury, Eva Hug, Erica Xu, Oleh Zagrijtschuk, Tudor E. Fertig, Daciana S. Marta, Heinz Gisslinger, Bettina Gisslinger, Martin Schalling, Ilaria Casetti, Elisa Rumi, Daniela Pietra, Chiara Cavalloni, Luca Arcaini, Mario Cazzola, Norio Komatsu, Yoshihiko Kihara, Yoshitaka Sunami, Yoko Edahiro, Marito Araki, Roman Lesyk, Veronika Buxhofer-Ausch, Sonja Heibl, Florence Pasquier, Violaine Havelange, Isabelle Plo, William Vainchenker, Robert Kralovics and Stefan N. Constantinescu. ***Secreted Mutant Calreticulins As Rogue Cytokines in Myeloproliferative Neoplasms***. Blood (en révision).

Contribution personnelle : Dans cet article où je signe comme co-premier auteur, j'ai traité les échantillons de sang périphérique provenant de patients CALR^m, JAK2^{V617F} ou bien de contrôles issus de cytophères pour extraire les CD34⁺. J'ai ensuite réalisé les expériences *in vitro* qui consistaient à étudier l'effet de la calréticuline recombinante WT ou mutée sur le nombre de colonies de mégacaryocytes après purification et tri des cellules CD34⁺ CD41⁺ (figure 6).



Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms

Mira El-Khoury^{1,2,3} · Xénia Cabagnols^{1,2,3} · Matthieu Mosca^{1,2,4} · Gaëlle Vertenoël^{5,6} · Christophe Marzac⁷ · Fabrizia Favale⁸ · Olivier Bluteau^{1,2,4} · Florence Lorre⁸ · Amandine Tisserand^{1,2,3} · Graciela Rabadan Moraes^{1,2,3} · Valérie Ugo⁹ · Jean-Christophe Ianotto¹⁰ · Jérôme Rey¹¹ · Eric Solary^{1,2,4,7} · Lydia Roy¹² · Philippe Rameau² · Najet Debili^{1,2,4} · Florence Pasquier^{1,2,4,7} · Nicole Casadevall^{1,2,13} · Caroline Marty^{1,2,4} · Stefan N. Constantinescu^{5,6,14} · Hana Raslova^{1,2,4} · William Vainchenker^{1,2,4} · Isabelle Plo^{1,2,4}

Received: 11 December 2019 / Revised: 5 June 2020 / Accepted: 11 June 2020 / Published online: 22 June 2020
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Limited 2020

Abstract

Mutations of calreticulin (*CALRm*) define a subtype of myeloproliferative neoplasms (MPN). We studied the biological and genetic features of *CALR*-mutated essential thrombocythemia and myelofibrosis patients. In most cases, *CALRm* were found in granulocytes, monocytes, B and NK cells, but also in T cells. However, the type 1 *CALRm* spreads more easily than the type 2 *CALRm* in lymphoid cells. The *CALRm* were also associated with an early clonal dominance at the level of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) with no significant increase during granulo/monocytic differentiation in most cases. Moreover, we found that half of type 2 *CALRm* patients harbors some homozygous progenitors. Those patients were associated with a higher clonal dominance during granulo/monocytic differentiation than patients with only heterozygous type 2 *CALRm* progenitors. When associated mutations were present, *CALRm* were the first genetic event suggesting that they are both the initiating and phenotypic event. In blood, type 1 *CALRm* led to a greater increased number of all types of progenitors compared with the type 2 *CALRm*. However, both types of *CALRm* induced an increase in megakaryocytic progenitors associated with a ruxolitinib-sensitive independent growth and with a mild constitutive signaling in megakaryocytes. At the transcriptional level, type 1 *CALRm* seems to deregulate more pathways than the type 2 *CALRm* in megakaryocytes. Altogether, our results show that *CALRm* modify both the HSPC and megakaryocyte biology with a stronger effect for type 1 than for type 2 *CALRm*.

These authors contributed equally: William Vainchenker, Isabelle Plo

Supplementary information The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41388-020-1368-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ William Vainchenker
william.vainchenker@gustaveroussy.fr

✉ Isabelle Plo
isabelle.plo@gustaveroussy.fr

¹ INSERM, UMR1287, Villejuif, France

² Gustave Roussy, Villejuif, France

³ Université Paris Diderot (Paris 7), UMR1287, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁴ Université Paris XI, UMR1287, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁵ Ludwig Institute for Cancer Research Brussels, Brussels, Belgium

⁶ Université Catholique de Louvain and de Duve Institute, Brussels, Belgium

⁷ Département d'Hématologie, Gustave Roussy, Villejuif, France

⁸ Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint-Antoine, CRSA, UMR_S 938, Paris, France

⁹ CHU Angers, Laboratoire d'Hématologie, Angers, France

¹⁰ CHRU Brest, service d'Hématologie, Brest, France

¹¹ Département d'Hématologie, Institut Paoli Calmettes, Service d'Hématologie, Marseille, France

¹² Assistance Publique Hôpitaux de Paris, CHU Henri Mondor, Service d'Hématologie, Créteil, France

¹³ Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Saint Antoine, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Paris, France

¹⁴ WELBIO (Wallon Excellence in Life Sciences and Biotechnology), Brussels, Belgium

Introduction

Classical *BCR-ABL1*-negative myeloproliferative neoplasms (MPN) include essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and primary myelofibrosis (PMF). They are clonal hematopoietic diseases due to a defect at the level of hematopoietic stem cells (HSC) that leads to an excess of myeloid cells. Presently, there are three main drivers in MPN. *JAK2V617F* is present in 60% of ET and PMF and in 95% of PV [1, 2]. Several thrombopoietin receptor (*MPL*) mutations have been identified in 5–10% of ET and PMF [3–5]. Around 50 different mutations in calreticulin (*CALRm*) were reported in 25–30% of ET and PMF [6, 7].

All *CALRm* induce a frameshift (+1), leading to a new quasi-identical positively charged C-terminal peptide and the loss of the KDEL sequence. The main difference between these mutations is the size of the residual normal sequence of the exon 9. The most recurrent mutations are *CALRdel52* type 1 and *CALRins5* type 2 mutations accounting for around 50% and 40% of ET and 80% and 10% of PMF, respectively [8, 9]. All other mutations are responsible for 10% of ET and 20% of PMF and have been classified into type 1-like and type 2-like based on the absence or presence of a residual wild-type calcium-binding motif and the modification of the α -helix structure [10, 11]. Several studies, including ours, have shown that *CALR* mutants activate the JAK2/STAT signaling pathway through the binding and the activation of *MPL* [12–15]. Moreover, retroviral mouse models after transduction of bone marrow to express either *CALRdel52* or *CALRins5* recapitulated the thrombocytosis with a much more severe phenotype for the *CALRdel52* mutant that led to a MF progression [15]. More recently, *CALRdel52* transgenic and knock-in (KI) mouse models have been generated. All of them lead to a moderate thrombocytosis without MF except a chimeric (mouse/human) *CALR* KI that showed a thrombocytosis progressing to MF [16–18].

There is strong evidence that *JAK2V617F* and *CALRm* define two different disorders with different outcomes. In contrast to *CALRm*, *JAK2V617F* disease occurs nearly 10 years later and patients present lower platelet counts, increased neutrophil counts, hemoglobin levels, and risk of thrombosis [19–21]. However, there are clinical differences between type 1 and type 2 *CALRm*. Type 2 mutations lead to ET with higher platelet counts than type 1 mutations, but are rare in PMF in contrast to type 1 mutations [8, 11, 19, 22]. There is also evidence that the variant allele frequency (VAF) of *CALRm* in granulocytes of ET is much higher than that of *JAK2V617F* suggesting that *CALRm* lead to a greater clonal dominance to induce a disease [6, 7, 21].

Here, we extensively studied the biological and genetic features of *CALR*-mutated ET and PMF patients on hematopoiesis.

Particularly, we evaluated the effects of type 1 and type 2 *CALRm* on clonal dominance and amplification of the hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) as well as their clonal advantage during myeloid and lymphoid differentiation. In addition, we carefully evaluated the role of the two different *CALRm* on the generation of megakaryocyte (MK) progenitors and the signaling and gene expression profiles in MK.

Results

CALRm are present in blood myeloid and lymphoid cells

We studied *CALRm* by fragment sizing in 24 patients including 11 type 1 and type 1-like (called type 1) and 13 type 2, and type 2-like (called type 2) patients, with the initial diagnosis of ET or PMF [23]. As shown in Fig. 1a, b, the VAF was high and similar in granulocytes and monocytes (27–55% VAF) whatever the type of *CALRm* or the nature of the disease (ET and MF). One exception was *CALRdel16* P52 patient, who presents a familial history (family including 4 MPN cases) and harbors an exceptionally low *CALRm* VAF. Lymphoid cells including NK cells (CD56⁺CD14⁻), B cells (CD19⁺) and T cells (CD3⁺CD19⁻CD56⁻CD14⁻) were sorted and obtained with a purity over 93% (Figs. S1 and S2). *CALRm* could be detected in all these populations including the CD3⁺ cells (P30, P48, P151, P38, P28, P50, P54, and P80). The VAF was low but could reach 18% excluding that this could be due to a contamination. Moreover, we observed significant different VAF between granulocytes or CD14⁺ cells and CD3⁺ cells for both types of *CALRm* mutations. However, VAF between granulocytes or CD14⁺ cells and CD19⁺ cells and VAF between CD56⁺ and CD3⁺ were only found significantly different for *CALR* type 2 ET, suggesting a lower advantage in B and T cells of *CALR* type 2 than *CALR* type 1 (Fig. 1c).

These results show that the *CALR* type 1 and, to a lesser extent, *CALR* type 2 are present in all the hematopoietic cells including the myeloid, but also the lymphoid cell compartments. These results suggest an early clonal amplification by *CALRm* in lympho/myeloid progenitors.

CALRm are present in hematopoietic progenitors

To directly demonstrate the role of *CALRm* in early clonal amplification, we purified the hematopoietic progenitors (CD34⁺) from peripheral blood and sorted into CD34⁺CD38⁻CD90⁺ (HSC-enriched progenitors), CD34⁺CD38⁻CD90⁻ (multipotent progenitors) and CD34⁺CD38⁺CD90⁻ (committed progenitors) cell fractions. When the number of CD34⁺ cells was low, cells were separated only

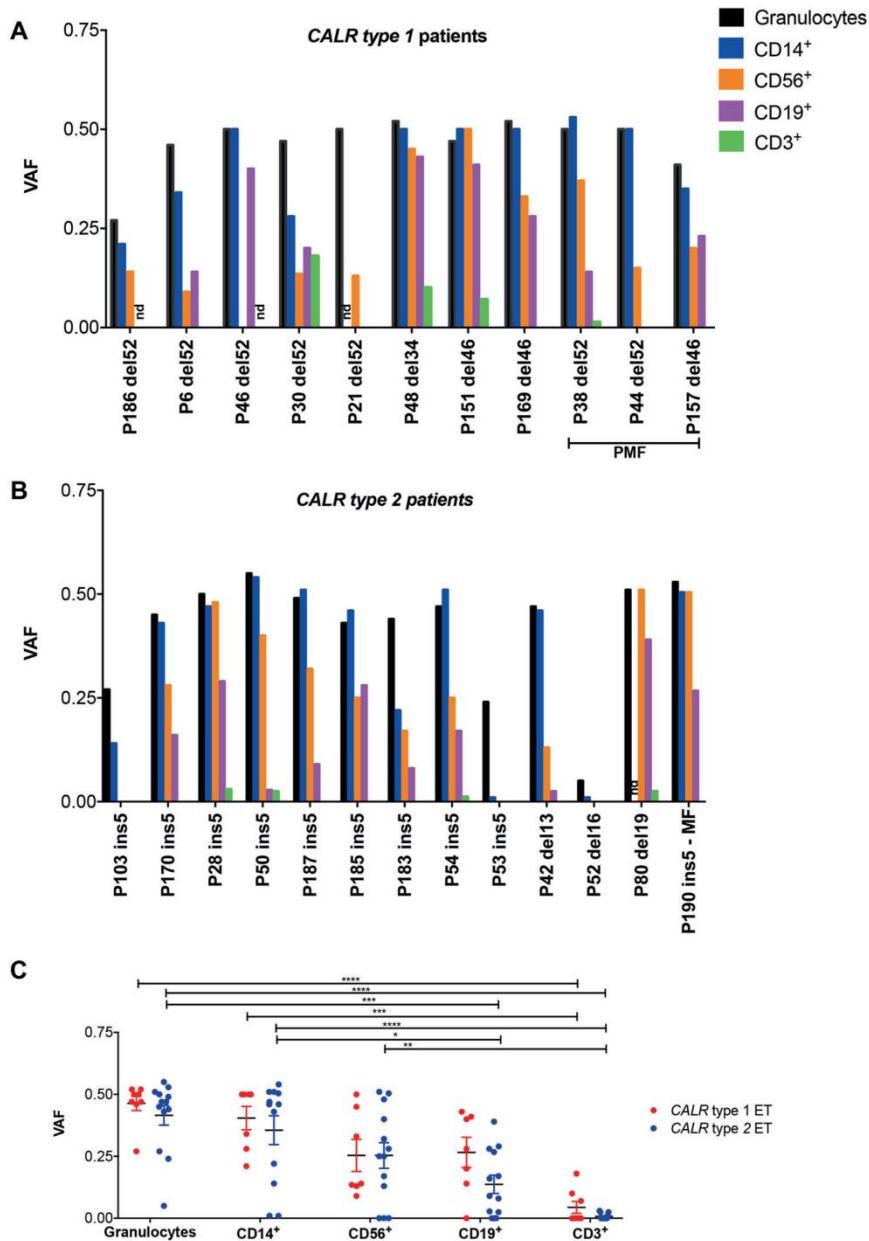
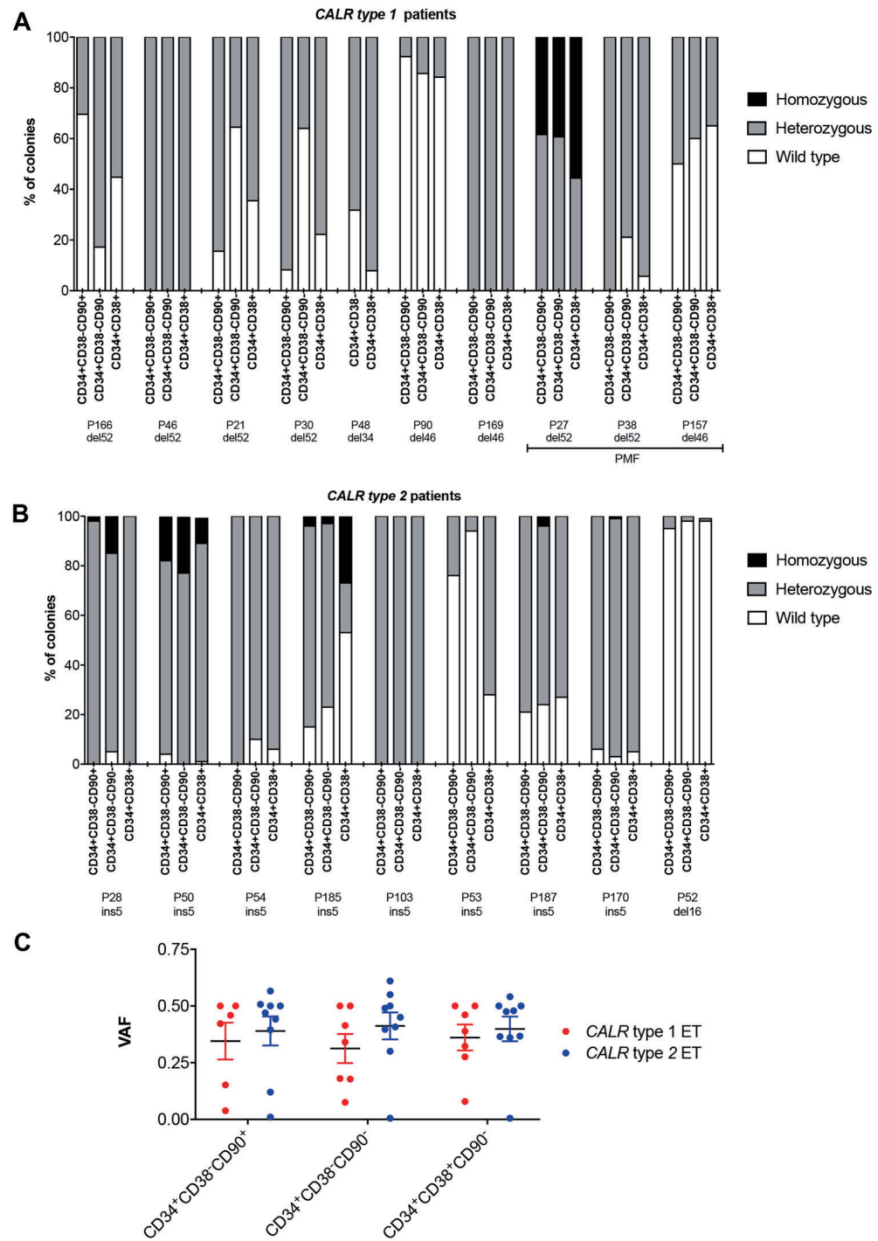


Fig. 1 *CALRm* are present in all hematopoietic cells. *CALR* variant allele frequencies (VAF) in granulocytes, CD14⁺, CD56⁺, CD19⁺, and CD3⁺ cells isolated from peripheral blood of ET or MF patients with type 1 or type 2 mutations. **a** *CALR* type 1 mutations (including *del52*, *del46*, *del34*), VAF were measured in DNA extracted from blood cells of 11 patients (8 ET and 3 PMF) using fragment sizing. VAF were 0% in CD3⁺ cells of P186, P6, P183, P46, P42, P169, P157, and P21. The following samples were not done (nd) for CD19⁺ of P186, CD56⁺ of P46, and CD14⁺ of P21. **b** *CALR* type 2 mutations (including *ins5*, *del13*, *del16*, and *del19*), VAF were measured in DNA extracted from blood cells of 12 ET and 1 MF patients using fragment sizing. VAF were 0% in CD3⁺ cells of P103, P170, P187 and P185, P52, P53, P80. The following sample was not done (nd) for CD14⁺ of P80 patient. **c** *CALR* type 1 and type 2 mutation VAF were calculated for ET patients in the different hematopoietic cells. Results are the mean ± SEM (***P* < 0.01; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001 Tukey's multiple comparisons test).

into CD34⁺CD38⁻ and CD34⁺CD38⁺ cell fractions. The clonal architecture of these fractions was studied after 14 days of culture of single cells directly cloned by cell

sorting in serum-free medium with cytokines. Therefore, all cell fractions were submitted to a double round of cell sorting leading to a purity over 97%. We studied 19 patients

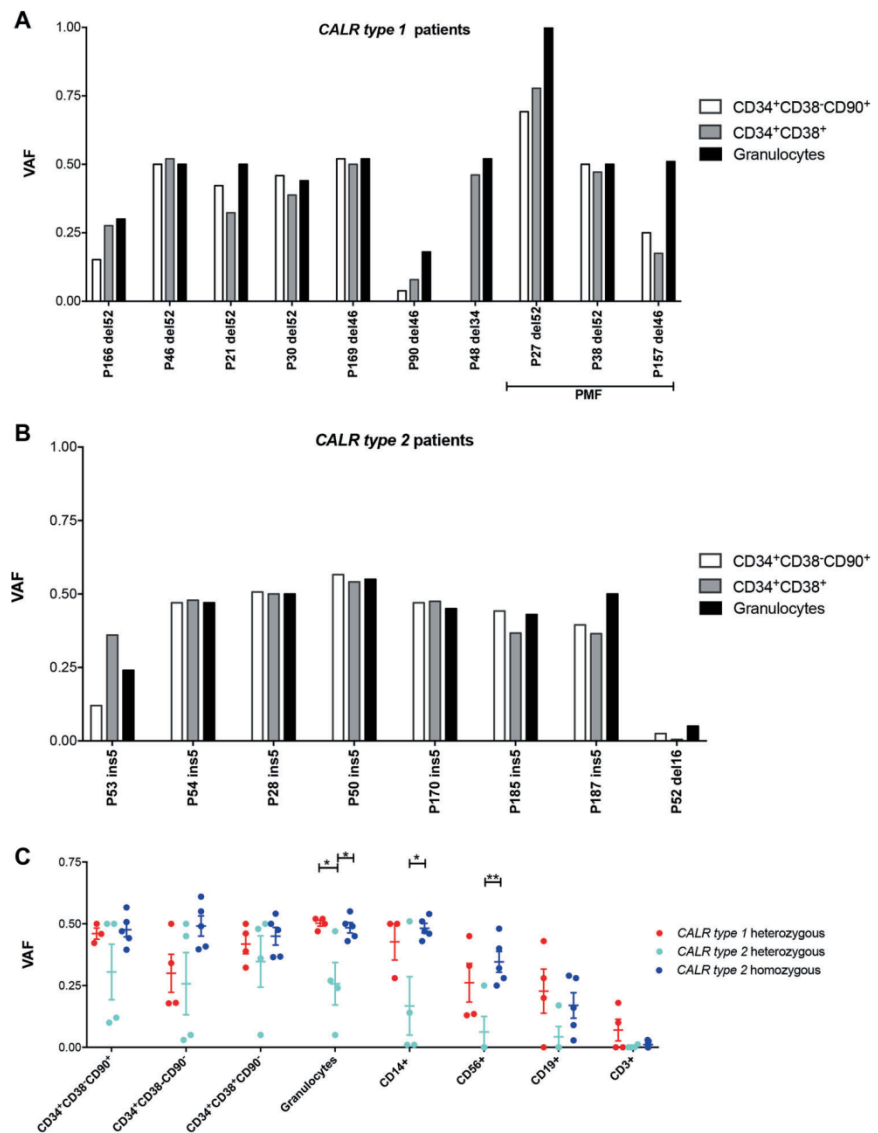
Fig. 2 *CALRm* harbor a high clonal dominance at the progenitor cell level. Clonal architecture was studied in stem cells-enriched progenitors ($CD34^+CD38^-CD90^+$), multipotent progenitors ($CD34^+CD38^+CD90^-$) and committed progenitors ($CD34^+CD38^+CD90^-$). Cells were cultured at single cell level in serum-free medium with cytokines for 14 days. Each colony was genotyped by conventional PCR or qPCR analysis for 7 ET or 3 PMF *CALR* type 1-mutated patients (a), and 9 *CALR* type 2-mutated patients (b) and the percentages of each genotype are indicated. The number of genotyped colonies are indicated in Table S3. c *CALR* type 1 and type 2 mutation VAF were calculated for ET patients in the different hematopoietic progenitors. Results are the mean \pm SEM (no significant differences by Tukey's multiple comparisons test).



including 10 with *CALRm* type 1 and 9 with *CALRm* type 2. Overall, the cloning efficiency was high in all fractions (mean of 70% in $CD34^+CD38^+CD90^-$, 59% in $CD34^+CD38^-CD90^+$, and 60% in $CD34^+CD38^+CD90^-$). We observed that the great majority of hematopoietic progenitors including the most immature $CD34^+CD38^-CD90^+$ cell fraction presented the *CALRm* (Fig. 2a, b). *CALRm* were detectable in more than 50% of progenitors except in two patients P52 (familial MPN) and P90 (early diagnosis with mild thrombocytosis (450,000/ μ L)).

Moreover, the percentage of *CALRm* HSC-enriched progenitors was comparable to *CALRm* committed progenitors (Fig. 2c). In four cases (P27, P46, P103, and P169), no detectable *CALRwt* progenitors were found. We did not detect any homozygous clone in *CALRm* type 1 ET patients except in one *CALRm* type 1 MF patient. In contrast, homozygous *CALRm* clones were more frequent in *CALRm* type 2 patients and found in five out of nine ET patients (P28, P50, P185, P187, and P170) (Fig. S3). Of note, we confirmed that these clones were truly

Fig. 3 *CALRm* are present at similar VAF in progenitors and mature cells. VAF were calculated in CD34⁺CD38⁻CD90⁺ and CD34⁺CD38⁺CD90⁻ progenitors and were compared to VAF in granulocytes performed by fragment analysis for 10 ET or MF *CALR* type 1-mutated patients (a), and 8 *CALR* type 2-mutated patients (b). c VAF for all cell types were calculated for paired data of 4 ET patients with heterozygous type 1 mutation in progenitors, 5 ET patients with a mixture of heterozygous and homozygous type 2 mutation in progenitors and 4 ET patients with heterozygous type 2 mutation in progenitors. Results are the mean ± SEM (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; Tukey's Multiple comparisons test).



homozygous and not hemizygous, as shown by the relative quantification of copy number of the normal and mutated alleles (Fig. S4).

Altogether, these results show that *CALRm* (type 1 and 2) are present in the HSC-enriched progenitors and give an advantage from the early stages of hematopoiesis in ET and PMF.

***CALRm* are present at similar VAF in progenitors and mature granulocytes**

In order to decipher the clonal amplification of the *CALRm* clone from the progenitor compartment to the mature cells, we calculated the VAF of the CD34⁺CD38⁻CD90⁺ and

CD34⁺CD38⁺CD90⁻ progenitors and compared them to the VAF of granulocytes. In almost all patients with any *CALRm*, VAF in progenitors was comparable to that found in granulocytes (30–50%) (Fig. 3a, b). The exception was the patients with a low *CALR* VAF in granulocytes (P166, P90, P53, and P52), who had an even lower *CALR* VAF in progenitors suggesting that *CALRm* clone amplifies between the HSC-enriched progenitors and the granulocytes. These results were confirmed by directly measuring the VAF in the CD34⁺CD38⁻CD90⁺ and CD34⁺CD38⁺CD90⁻ cell fraction in five patients. We also analyzed the *CALRm* VAF in platelets using RNA and compared it to the DNA VAF in granulocytes. Unexpectedly, we found a

lower *CALRm* VAF in platelets than in granulocytes (Fig. S5). These results led us to compare the *CALRm* VAF in CD34⁺ cells using DNA or RNA where we observed that the RNA VAF was significantly lower than the DNA VAF for type 2 *CALR*, suggesting that *CALRm* VAF might be underestimated by using RNA instead of DNA.

We tested the impact of *CALR* status (homozygous or heterozygous) on clonal advantage during myeloid and lymphoid differentiation. We define three groups of patients based on progenitor status: heterozygous type 1, heterozygous type 2, and mixture of heterozygous and homozygous type 2. We used paired data of 4–5 ET patients and calculated the VAF of *CALRm* for all cell types (early progenitors and late differentiated cells) (Fig. 3c). We observed that heterozygous *CALR* type 1 patients harbor similar VAF than homozygous *CALR* type 2 patients in progenitors and differentiated cells. In contrast, heterozygous *CALR* type 2 had a similar VAF than the two other groups in progenitors (CD34⁺CD38⁺), but with significantly lower VAF in all differentiated cells (Tukey's multiple comparison test: *CALR* type 1 vs heterozygous *CALR* type 2, $P < 0.01$; and homozygous *CALR* type 2 vs heterozygous *CALR* type 2, $P < 0.0001$).

These results demonstrate that *CALRm* give a clonal advantage in the HSPC compartment, which spreads in the mature granulocytic cells. Moreover, our results suggest that heterozygous *CALRm* type 1 gives a stronger advantage during differentiation than heterozygous *CALRm* type 2.

***CALRm* are an early genetic event in ET patients**

Next, we performed a next generation sequencing either by WES or using a 77-gene targeted myeloid panel of 36 *CALRm* patients mainly in granulocytes. In 15 out of 36 patients (9/19 type 1 and 6/17 type 2), other potential driver mutations were found including *PHF6*, *TET2*, *SETD1B*, *DNMT3A*, *SF3B1*, *SH2B3*, *CDH6*, and a new *PIK3CD* mutations (Fig. 4a). In nearly all cases, except P157 PMF patient with a *SF3B1* mutation, the VAF in granulocytes was higher for *CALRm* (type 1 or type 2) than for the other mutations suggesting that *CALRm* was the first genetic event (Fig. 4b). To confirm this, we studied the clonal architecture by genotyping each hematopoietic progenitor progeny in five patients. Colonies with only *CALRm* were observed and all other mutations were found in *CALRm* colonies including the ones with *SF3B1* mutation (Fig. 4c). These results confirm that *CALRm* is the first genetic event in most cases.

***CALRm* induce a strong CFU-MK spontaneous growth**

Since the spontaneous growth and the hypersensitivity to cytokines are a hallmark of *JAK2V617F* patients, we tested

the impact of *CALRm* on these features. For that purpose, we cultured the mononuclear cells (MNCs) of 17 patients bearing *CALRm* (12 type 1 and 5 type 2) and 3 controls from healthy donors in methylcellulose and enumerated the BFU-E, CFU-G/GM/M- and CFU-GEMM-derived colonies. We found an increase in the number of BFU-E and CFU-G/GM/M for type 1 *CALRm* patients compared to controls (Fig. 5a, c). We did not observe any spontaneous growth of BFU-E or CFU-GEMM in the absence of cytokine in neither the controls nor the *CALRm* patients (Fig. 5a). However, we detected a variable but not significant spontaneous growth of CFU-G/GM-derived colonies in the absence of cytokine in *CALRm* patients compared to controls. We then cultured the MNC of 15 *CALRm* patients (11 type 1 or 4 type 2) and 3 controls from healthy donors in fibrin clot assay and counted the CFU-MK-derived colonies. We found an increase in the number of CFU-MK for both type 1 and 2 *CALRm* patients as compared to controls (Fig. 5b, c). Moreover, we observed a major spontaneous growth of CFU-MK in the presence of SCF alone or in the absence of any cytokine in *CALRm* patients (12% for type 1 and 22% for type 2) compared to controls (Fig. 5b). Finally, after cell purification and sorting, we confirmed a 4.5-fold increase in the number of CD34⁺ progenitors/mL of blood in *CALRm* type 1 patients compared to *CALRm* type 2 patients (Fig. 5d).

In aggregate, these results show that *CALRm* induce a strong spontaneous growth of CFU-MK progenitors. Moreover, they show that *CALRm* type 1 induce a significant increase in total number of progenitors in the blood while *CALRm* type 2 only increase CFU-MK.

In order to determine the role of JAK2 and PI3K in the spontaneous growth of CFU-MK, we cultured the CD34⁺ cells from 3 healthy donors (Fig. 5e) and 16 *CALRm* ET or MF patients in fibrin clot assays with or without cytokine and in the presence of ruxolitinib (0.5 μM) or LY294002 (10 μM) (Fig. 5f). We observed a significant decrease in the spontaneous CFU-MK growth in the presence of both inhibitors, particularly in absence of TPO. Even if these inhibitors are not specific, these results suggest that the JAK2/PI3K signaling pathways may be important for the *CALRm*-induced spontaneous growth of CFU-MK.

***CALRm* induce a constitutive JAK2-STAT-ERK-AKT signaling in MK**

In order to investigate if *CALRm* could constitutively activate signaling pathways in primary patient cells, we cultured CD34⁺ progenitors from three control donors, and one *JAK2V617F*, one *CALRdel52* and three other *CALRm* type 1 patients in MK culture conditions. No *CALRm* type 2 patients could be studied due to lack of sufficient amount of

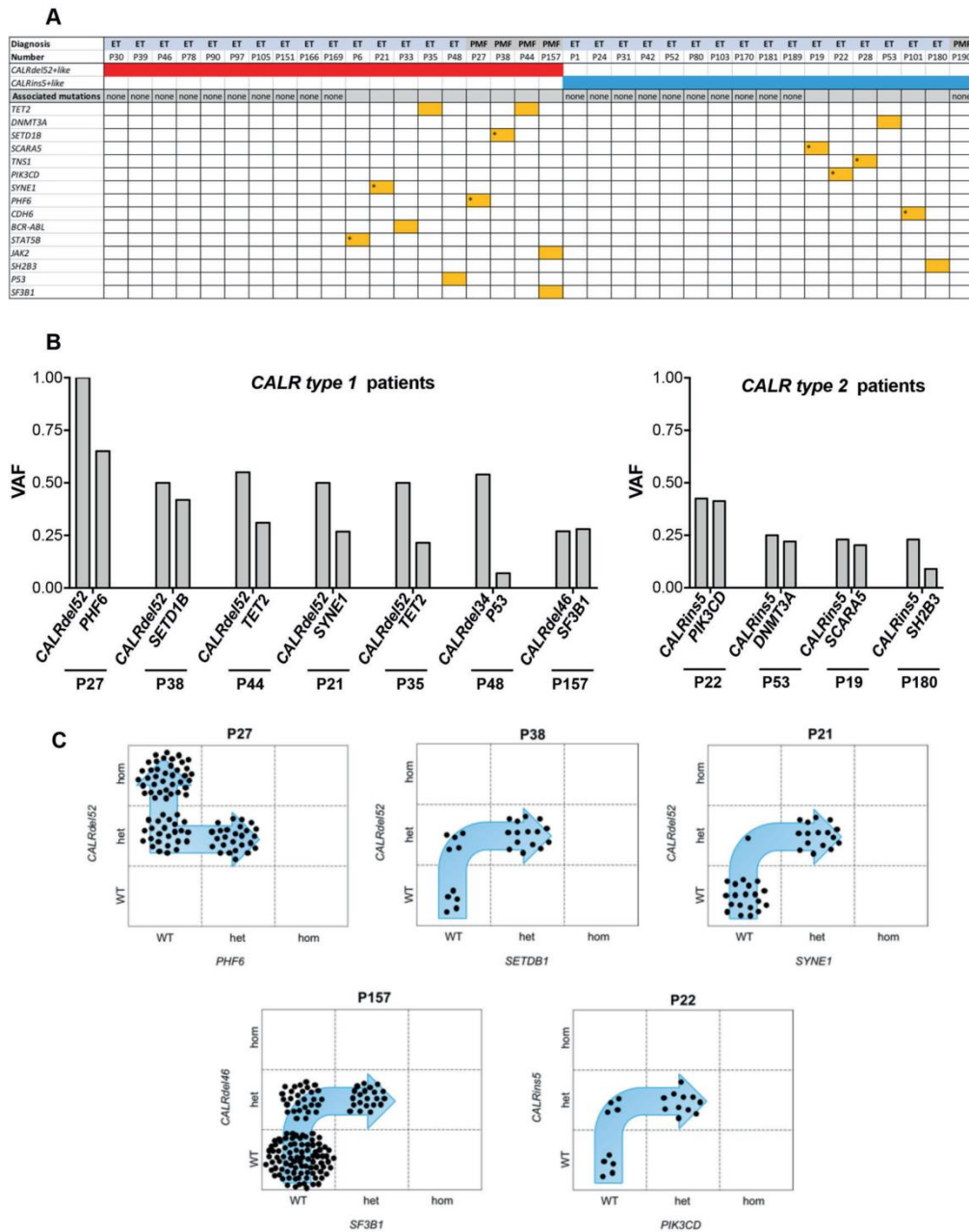


Fig. 4 *CALRm* is the first event in hematopoiesis. **a** Mutational status of 36 ET or MF patients with *CALR* type 1 or 2 mutations were done in granulocytes (31 patients) or whole blood cells (5 patients). Additional associated mutations identified by WES (*) or NGS are indicated. **b** *CALR* type 1 or type 2 mutations and associated mutations (*PHF6*, *SETD1B*, *SYNE1*, *TET2*, *SCARA5*, *PIK3CD*, *DNMT3A*, *P53*, *SH2B3*, and *SF3B1*) VAF were determined in DNA from granulocytes by NGS (2% sensitivity) or WES (10% sensitivity). **c** Clonal

architecture was performed after sorting CD34⁺CD38⁺ progenitor cells at single cell level. Each progenitor was grown in serum-free medium with cytokines. 14 days later, each progeny was genotyped for *CALRm* by conventional PCR analysis and for associated gene mutations by sequencing analysis or allelic discrimination by qPCR (*SF3B1*). Figures show the number of colonies heterozygous, homozygous or wt for *CALRm* and *SETD1B*, *SYNE1*, *PHF6*, *SF3B1*, and *PIK3CD* and (P27, P38, P21, P157 and P22).

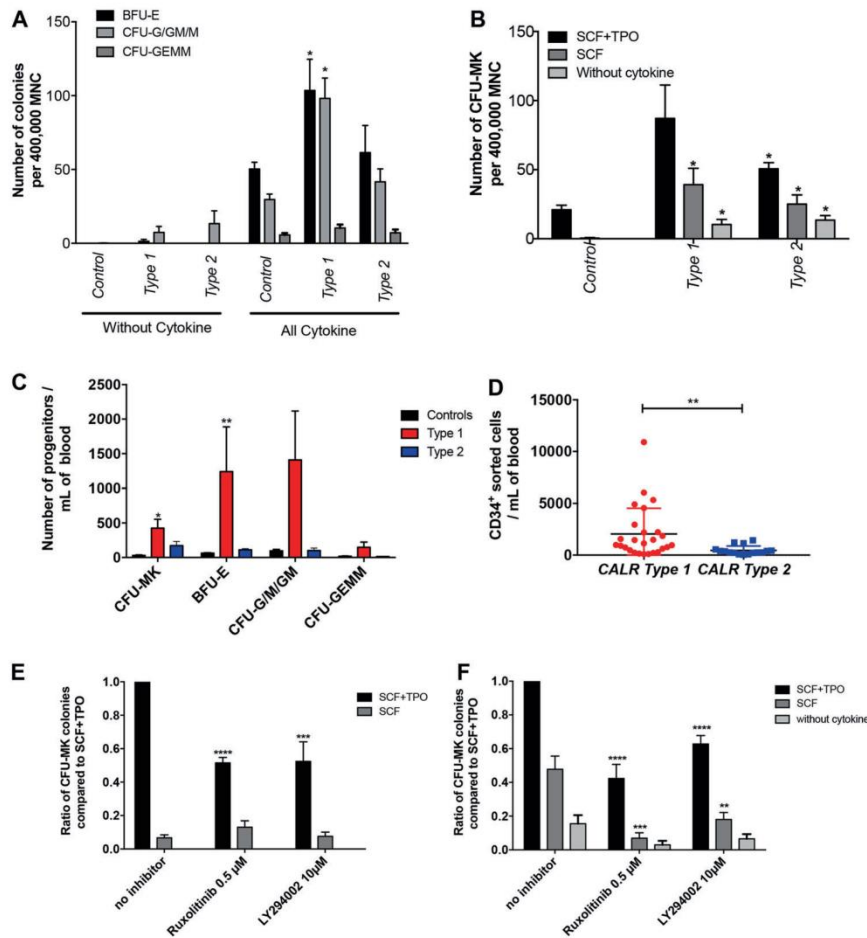


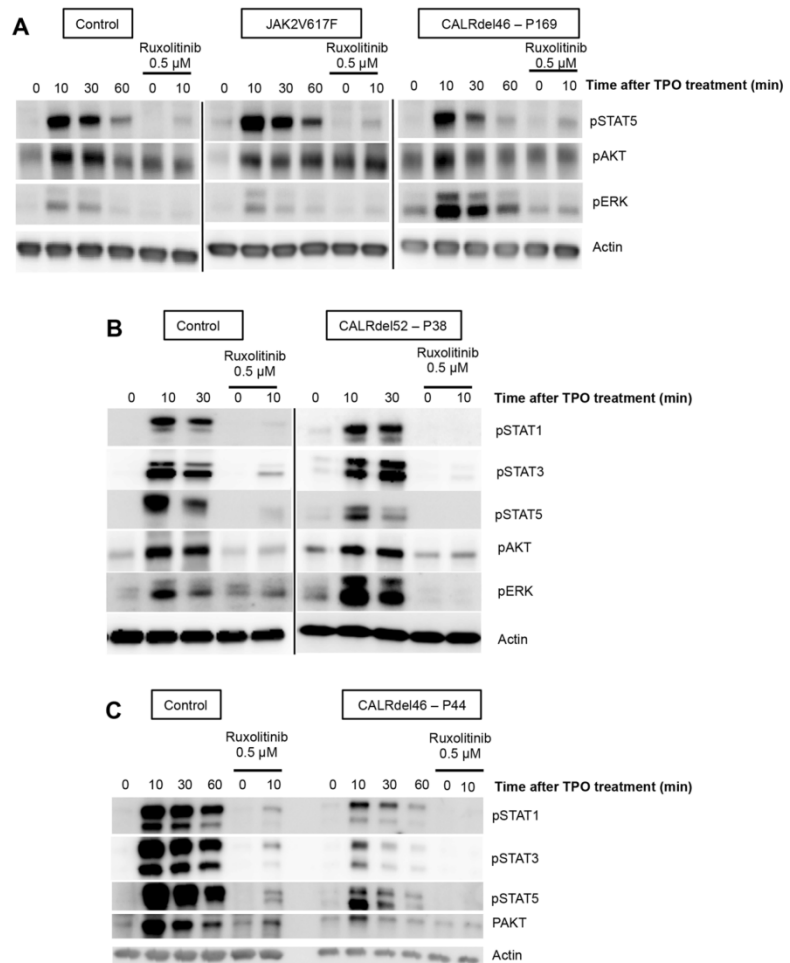
Fig. 5 *CALRm* induce a spontaneous growth of megakaryocytic progenitors dependent on JAK2 and PI3K. **a** Monocyte-depleted MNCs (400,000) from 17 *CALR*-mutated patients (9 ET and 3 PMF type 1 and 5 ET type 2) and 3 healthy donors were cultured in methylcellulose with or without cytokine (SCF, IL-6, IL-3, G-CSF, and EPO) and the BFU-E, CFU-GEMM, CFU-G/GM/M were counted at day 14. Results are the mean \pm SEM ($*P < 0.05$; Mann-Whitney test, two tailed). **b** MNCs (400,000) from 15 *CALR*-mutated patients (11 type 1 and 4 type 2) and 3 healthy donors were cultured in fibrin clot supplemented with SCF and TPO, SCF alone or without cytokine. CFU-MK colonies were counted in triplicate for each condition after CD41 staining at day 10 of culture. Results are the means of 15 patients \pm SEM ($*P < 0.05$; Mann and Whitney test compared to controls, two tailed). **c** The number of progenitors/mL of blood were calculated for BFU-E, CFU-G/GM/M, CFU-GEMM (12 type 1 and 4

type 2) for CFU-MK (10 type 1 and 3 type 2). Results are the mean \pm SEM ($*P < 0.05$; Mann and Whitney test, two tailed). **d** CD34⁺ progenitors from *CALR* type 1 or type 2-mutated patients were purified from MNC by immunomagnetic enrichment followed by cell sorting with an anti-CD34 antibody. Results are the mean \pm SEM of the number of CD34⁺/mL of blood. Type 1 patients ($n = 25$) and type 2 patients ($n = 16$) ($**P < 0.01$; Mann and Whitney test, two tailed). **e/f** CD34⁺ progenitors from controls (**e**) or type 1-mutated patients (**f**) were cultured in fibrin clots with SCF and TPO, with SCF alone or without cytokine and in the absence or presence of ruxolitinib (0.5 μ M) or LY294002 (10 μ M). CFU-MK colonies stained with an anti-CD41 antibody were counted at day 10. Spontaneous growth was calculated compared to SCF + TPO. Results represent the mean of the ratio of CFU-MK for each condition compared to CFU-MK cultured in SCF + TPO \pm SEM ($*P < 0.05$; Mann and Whitney test, two tailed).

CD34⁺ progenitors. CD41⁺CD42⁺ MK cells were sorted, cytokine and serum-starved and re-stimulated with TPO for 10, 30 or 60 min with or without ruxolitinib. A mild constitutive phosphorylation of STAT5 was observed in a *JAK2V617F*-positive patient. Similarly, *CALRdel52* or *CALRdel46* cells showed a constitutive phosphorylation of

STAT3, ERK and AKT compared to controls (Figs. 6 and S6). Moreover, we noticed an important TPO-induced phosphorylation of ERK in the presence of *CALR* mutants compared to controls. Pretreatment with ruxolitinib led to a decreased phosphorylation of all TPO-induced phosphorylated molecules.

Fig. 6 *CALR* type 1 mutation induces constitutive signaling. CD34⁺ progenitors from three control donors or one *JAK2V617F*- or three *CALR*-mutated patients were cultured in serum-free medium with SCF and TPO. Megakaryocytes (CD41⁺CD42⁺) were serum- and cytokine-starved for 16 h and preincubated or not with ruxolitinib (0.5 μM) prior to time-dependent stimulation with 10 ng/mL TPO. Phosphorylation status of STAT1/3/5, AKT and ERK were analyzed by Western blotting. Expression of β-Actin was used as loading control. **a–d** Represent four independent experiments.



Altogether, these results showed that *CALR* mutants induce a mild constitutive signaling.

CALRm induce gene deregulation profiles in MK

In order to investigate if *CALRm* can deregulate gene expression profile and to identify specific pathways, CD34⁺ cells from five healthy donors and four ET patients with *CALRm* (two with type 1 (del46 and del52) and two with type 2 (del13 and del19)) were in vitro cultured in SCF + TPO condition to enable megakaryocytic differentiation. MK were sorted and RNA were submitted to transcriptomic analysis using gene arrays. Deregulated genes found in primary MK were crossed with the one found in murine Ba/F3 cell lines overexpressing or not different types of *CALRm* (type 1 (del52, del34, and del46) and type 2 (del19 and ins5)). The differentially expressed genes from *CALRm*, *CALR* type 1, and *CALR* type 2 were submitted to gene set enrichment analysis for up- and down-regulated genes using molecular

signatures database gene sets (collection Hallmark). We identified very similar pathways in *CALRm*, *CALR* type 1, or *CALR* type 2 samples, such as STAT5 and the MTORC1 signaling, as expected, but also the interferon gamma response, metabolism regulation (glycolysis, cholesterol, adipogenesis, and fatty acid), the unfolded protein response (UPR) and protein secretion (Figs. 7a and S7). Apoptosis, hypoxia, P53, the TNFα-NF-κB pathways were found downregulated while G2M checkpoint, MYC and E2F target pathways were enriched compared to controls. Of note, adipogenesis and cholesterol homeostasis were negatively enriched in *CALR* type 1 and adipogenesis and fatty acid metabolism were positively enriched in *CALR* type 2 cells. Using gene set enrichment method selection (enrichKEGG), we found that other expected signaling pathways including PI3K-AKT, calcium, cAMP and cGMP, and actin cytoskeleton were deregulated in the three datasheets (Fig. S8). Then, we performed a more stringent analysis consisting of a pairwise comparison with a classic two-fold change and

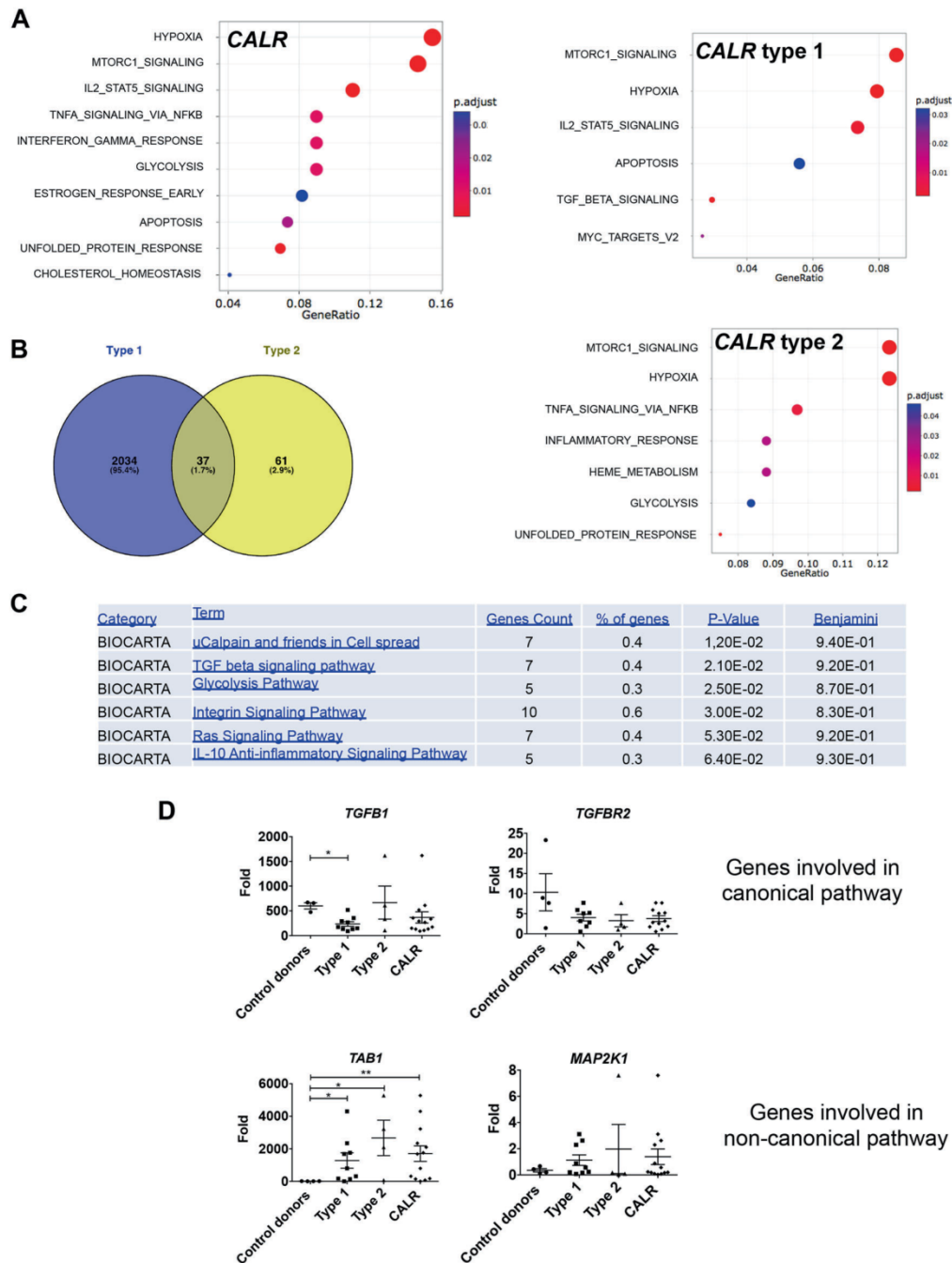


Fig. 7 *CALR* type 1 and type 2 mutations induce mild gene expression deregulation in megakaryocytes. $CD34^+$ progenitors from five control donors or two type 1 (P38 and P169) and two type 2 (P42 and P80) *CALRm* patients were cultured in serum-free medium with SCF and TPO and megakaryocytes (MK) ($CD14^-CD41^+CD42^+$) were sorted. Gene expression analysis was conducted. **a** Gene set enrichment analysis (GSEA) of the hallmark gene sets using the differentially expressed genes between *CALRwt* and *CALR* or type 1 or *CALR* type 2. Adjusted *P* value in red-blue color scale. **b** Venn

diagram of deregulated genes are shown for *CALR* type 1 and type 2. **c** David functional analysis using functional annotation chart (Biocarta) indicates five pathways. The term (pathways), the number and % of genes found in the pathways and the *P* value and the Benjamini adjusted *P* value are indicated. **d** Validation of genes involved in $TGF\beta$ signaling in MKs from 3–4 controls, from 9 type 1 *CALR*-mutated patients and 4 type 2 *CALRm* patients. *CALR* category regroups type 1 and type 2 *CALR*-mutated patients. Results are the mean \pm SEM (**P* < 0.05; ***P* < 0.01; Mann–Whitney test, two tailed).

FDR < 0.05 as a cutoff resulting in a list of differentially expressed genes for *CALR* type 1 and type 2 MK. We found 2070 genes deregulated for human *CALR* type 1 MK and only 98 genes for human *CALR* type 2 MK, suggesting either a greater gene deregulation with type 1 than with type 2 mutation or a reduced power analysis for type 2 MK due to low number of samples. Only 37 genes were common to both type 1 and type 2 MK (Fig. 7b). Moreover, David functional analysis using Biocarta indicated five pathways affected in *CALR* type 1 and none in *CALR* type 2: mu calpain and friends in cell spread, TGF β signaling, glycolysis, integrin signaling, Ras signaling, and IL-10 anti-inflammatory pathway (Figs. 7c and S9). Since the TGF β signaling was also specifically deregulated in the GSEA of *CALR* type 1 MK, we focused on this pathway.

We partially validated the TGF β pathway with a *TGFB1* downregulation in *CALRm* type 1 patients only but a *TAB1* upregulation in both type 1 and type 2 *CALRm* patients (Fig. 7d). Altogether, these results suggest a mild transcriptomic deregulation in *CALRm* MK, eventually more prominent with type 1 than with type 2 mutations.

Discussion

There is now strong clinical evidence that *CALRm* and *JAK2V617F* define two different ET entities. *CALRm* are associated with increased platelet levels, lower leukocyte counts, and hemoglobin levels and risk of thrombosis, as well as the younger occurrence of the disease [8, 9, 21, 24]. From the biological point of view, the VAF is surprisingly much higher in granulocytes for *CALRm* than for *JAK2V617F* although the clinical course of the former patients seems milder [6, 7, 21]. This correlates with a clonal pattern of X chromosome inactivation in granulocytes in the great majority of female *CALRm* ET patients and in a minority of *JAK2V617F* ET [25].

In this study, we have largely extended these data by showing that *CALRm* give a clonal dominance in early steps of hematopoiesis, a result in sharp contrast to what has been demonstrated for *JAK2V617F* [26–28]. We have shown that *CALRm* are present in nearly all progenitors with an HSC-enriched phenotype in patients with a VAF around 50% and in downstream granulocytes with similar VAF as observed by Kjaer et al. [29]. A lower allelic burden in granulocytes generally corresponds to a lower clonal dominance in early and late hematopoietic progenitors. We found only few exceptional cases in this situation either early diagnosis of ET with (450,000 platelets/ μ L) or case with clear germline predisposition factor that might cooperate with *CALRm* for disease development. At least, we could demonstrate that *CALRm* target a lympho-myeloid progenitor. Indeed, *CALRm* were detected in granulocytes, monocytes, B and NK cells

and were also detected in certain ET patients in CD3⁺ cells with lower VAF according to previous finding [29]. However, here, we pointed out that the *CALRm* type 1 spreads more easily than the *CALRm* type 2 in lymphoid cells. In ET and PV in contrast to PMF, *JAK2V617F* can be hardly detected in lymphoid cells [30]. Further experiments are required using xenograft transplantation to demonstrate whether the *CALRm* clone takes a clonal advantage either in a multipotent lympho/myeloid cell compartment or in a true long-term reconstituting hematopoietic cell. However, our results are different from a recent report that shows a major increase in VAF between the CD34⁺CD38⁻ and the CD34⁺CD38⁺ cell fractions in *CALRm* ET patients, but not in PMF patients, without discriminating between type 1 and type 2 mutations [31]. This difference can be explained by a potential bias in *CALRm* detection by RNA versus DNA sequencing as already shown for other mutations [32] and in our study using RNA from platelets. However, the differences between DNA and RNA based assays for *CALRm* were only observed for the type 2 mutations in progenitors, partially explaining the difference with the work of Nam et al. Presumably, the mRNA of the mutated form can be unstable in certain cells particularly in HSC-enriched cells that are more quiescent. In addition, their analyses were only done on the basis of cell surface markers in contrast to our study that was performed on progenitor functional capacities.

Altogether this means that *CALRm* target a lymphoid/myeloid progenitor and increase its biological properties at a greater extent for type 1 than for type 2, leading to a clonal advantage, but without further amplification of late stages of differentiation except for the MK lineage (Fig. S10). Thus, we may also speculate that *CALR* mutants should induce a high HSPC clonal dominance to give rise to a disease. This may explain that homozygous clones in *CALRm* type 2 patients are frequently observed as this mutation appears to give less clonal advantage than *CALRm* type 1. This is opposite to *JAK2V617F* that gives a main advantage to all myeloid lineages during differentiation and a low or no advantage to the HSC compartment [33–35]. The presence of other mutations such as in *TET2* and *DNMT3A* is required for *JAK2V617F* to give advantage at the early stages of hematopoiesis in ET or PV. Although these epigenetic mutations can be secondary events [36, 37], they usually predate *JAK2V617F* [38, 39]. In contrast, *CALRm* are early genetic events in ET with very few additional mutations. As previously reported, we observed associated mutations including *TET2*, *DNMT3A*, *PHF6*, *TP53*, *SH2B3*, *SETDB1*, and *SF3B1* as secondary events that may, thus, be associated with disease progression rather than with disease initiation [6, 7, 39]. In contrast, Nam et al. described one case with a *SF3B1* mutation that may have preceded *CALRm*, but it is possible that this patient might have been misdiagnosed as a MPN instead of a refractory anemia with

ring sideroblasts with thrombocytosis (RARS-T) in which the *SF3B1* precedes other mutations [31]. Homozygous *JAK2V617F* and *MPLW515* mutations due to LOH have been largely reported and are associated with disease phenotypic changes (ET to PV/MF for *JAK2V617F* and ET to MF for *MPLW515*) [1, 40, 41]. In half cases, we have found homozygous type 2 *CALRm* progenitors according to a previous report [6] suggesting that the HSPC clonal dominance should be particularly elevated for this molecular type of disease. In contrast, only one patient with a homozygous type 1 *CALRm* was found and was associated with disease progression toward MF and leukemia. In contrast, Kjær's group does not report any homozygous clones in either the 13 *CALRm* type 1 ET/PMF or the 4 *CALRm* type 2 pre-MF [29].

Here, we have mostly used *CALRm* type 1 MK cells for signaling studies because we recover more CD34⁺ cells from *CALRm* type 1 than for *CALRm* type 2 ET patients. Our data suggest a higher mobilization of CD34⁺ cells by *CALRm* type 1 than by *CALRm* type 2 or eventually that type 1 has a greater proliferative impact on CD34⁺ cells (Fig. 5). Previous studies have afforded evidence that an increased circulating CD34⁺ cell level is a very early event in MF already detected at the "prefibrotic" stage [42]. Therefore, it is possible that *CALRm* type 1 ET is a "forme frustre" of MF as *JAK2V617F* ET is a "forme frustre" of PV [43]. This hypothesis is in agreement with the retroviral mouse model where *CALRdel52* induces an ET, which quickly progresses to MF [15, 17]. This may imply that there is a continuum between a true *CALRm* type 1 ET and MF. Accordingly, differences in *CALRm* type 1 and 2 have been found in proplatelet formation in primary cells [44]. In contrast, *CALRm* type 2 ET patients have been shown to harbor higher platelets counts than type 1 ET patients [44]. This could be explained by the presence of homozygous *CALRm* type 2 MK that can produce larger numbers of platelets than heterozygous *CALRm* type 1 or 2 MK. Finally, our gene expression analysis in MK revealed that *CALRm* type 1 might induce a greater gene deregulation than *CALRm* type 2 even if this result could also be the consequence of a lack of statistical power due to low number of patients. We propose that *CALRm* type 1 might regulate specific pathways such as actin-cytoskeleton, integrin signaling, and inflammation that might be implicated in MF progression [45]. TGF β pathway was also found differentially deregulated in type 1 MK, with an upregulation of non-canonical genes and a downregulation of canonical genes. Moreover, the two types of *CALRm* appear to have opposite effect on the regulation of lipid metabolism. Overall, *CALRm* MK present an upregulation in pathways involved in cell cycle, but a downregulation of pathways involved in UPR, TNF α via NF- κ B activation and

apoptosis including P53 pathway with overlapping genes. Some of the identified pathways (TGF β 1, NF- κ B, and UPR) were also seen to be upregulated in progenitors and granulocytes by gene expression analysis [31, 46]. Finally, the normal interaction between CALR and the proteins involved in ER function (ERP57), UPR (BIP and GRP75), and the cytoskeleton (MYL9) have been shown to be modified by *CALRm* [47–49].

Finally, we have shown that the MK/platelet phenotype may be due to a TPO independent growth of CFU-MK, as previously reported [50]. In addition, this TPO independent growth is dependent of JAK2 activation, as it was inhibited by ruxolitinib, even at a low dose that only exhibits a mild inhibitory effect on TPO-induced growth. Concomitantly, we observed that *CALR* type 1 mutants induce a constitutive signaling (particularly on STAT and ERK molecules), which is inhibited by ruxolitinib, as previously shown in cell lines [12–15]. We do not know if all the *CALRm* effects on HSPC are also dependent of JAK2, but from knockout animals there is strong evidence that JAK2 plays also an important role in HSC biology. In any case, it is interesting that *CALRm* affect both the HSC and MK/platelet biology. It has been underscored that MK and HSC have numerous common features with the existence of a MK-biased HSC at the top of HSC hierarchy [51, 52]. TPO, the growth factor regulating platelet production plays also a central role in the regulation of HSC compartment through MPL and JAK2 signaling. Thus, an obvious hypothesis is that *CALRm* activate this pathway both in HSC and MK. However, it remains that *JAK2V617F*, which also activates MPL, appears to have different effects on HSC than *CALRm*, thus it is possible that CALR mutants may also either use other signaling pathways including calcium signaling and UPR or activate MPL signaling in a different way than *JAK2V617F*. This comparison will be a powerful approach in the future to characterize the signaling pathways involved in HSC regulation.

Altogether this study demonstrates that *CALRm* ET is a disease of the HSC and of the MK/platelet lineage, which is different from *JAK2V617F* ET. It also indicates a stronger deregulation of hematopoiesis by *CALRm* type 1 in comparison to *CALRm* type 2, leading to a stronger MPN phenotype. It will be important to understand if these two main different biological features sustain the clinical differences between *JAK2V617F*- and *CALRm*-ET.

Materials and methods

Patient cohort

Blood samples were obtained from Gustave Roussy (Villejuif, France), Saint Louis Hospital (Paris, France), Saint

Antoine Hospital (Paris, France), Henri Mondor Hospital (Créteil, France), and Brest Hospital (Brest, France) with the agreement from the Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France IV-Institutional review board (agreement from US Department of Health and Human Services (no. IRB 00003835-Protocol 2015/59-NICB) and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (authorization #915663). Written informed consents were obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. In most of the patients, the diagnosis was performed according to the WHO recommendation with a bone marrow biopsy (Table S1) [24].

Cell purification and culture

Peripheral blood from patients was collected in citrate or EDTA tubes. No difference was observed between the two types of anticoagulant except that citrate allows a better platelet recovery. Granulocytes were obtained after hematopoietic cell separation on a ficoll gradient density. Hematopoietic progenitors (CD34⁺) were isolated from mononuclear cells (MNCs) by immunomagnetic enrichment (Miltenyi, Biotec). T cells (CD56⁻CD14⁻CD3⁺), B cells (CD56⁻CD14⁻CD19⁺), monocytes (CD14⁺), and NK cells (CD14⁻CD56⁺) were sorted by the Influx flow cytometer (Becton Dickinson) with a purity >95%. The following cell fractions CD34⁺CD38⁻CD90⁺, CD34⁺CD38⁻CD90⁻ and CD34⁺CD38⁺CD90⁻ were cloned at 1 cell/well and cultured in presence of a cocktail of human recombinant cytokines containing EPO (1 U/mL) (Amgen Thousand Oaks, CA), TPO (20 ng/mL) (Kirin, Japan), SCF (25 ng/mL) (Biovitrum AB, Sweden), IL-3 (10 ng/mL), FLT3-L (10 ng/mL), G-CSF (20 ng/mL), and IL-6 (10 ng/mL) (MiltenyiBiotec). Fourteen days later, individual colonies were plucked and lysed with proteinase K and 0.2% Tween 20 (Sigma) at 65° for 60 min and 95 °C for 15 min. DNAs colonies were genotyped with two techniques, a conventional PCR amplification and a quantitative PCR amplification using specific primers for type 1 and type 2 as previously described (Table S2) [53].

Quantification of clonogenic progenitors in semi-solid cultures

Monocytes were depleted from blood MNC using an immunomagnetic cell sorting system (AutoMacs; MiltenyiBiotec) with anti-CD14 antibody coupled microbeads. Then, the remaining MNCs (4×10^5 cells/mL per condition) were seeded in semi-solid cultures either in methycellulose medium (H4230 Methocult, Stem Cell Technologies) without cytokine or supplemented with 25 ng/mL SCF, 10 ng/mL IL-3, 10 ng/mL IL-6, 20 ng/mL TPO, 1 U/mL EPO, and 20 ng/mL G-CSF to quantify erythroid (BFU-E),

granulomonocytic (CFU-GM) and granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (GEMM) progenitors. Cultures were scored after 12–14 days for all colonies. The colonies were plucked using PBS 1x, lysed with proteinase K and DNA was used for genotyping.

Cells (4×10^5 MNC or 500–1000 CD34⁺) were seeded in serum-free fibrin clots either without cytokine or with 25 ng/mL SCF and 20 ng/mL TPO, or SCF alone to quantify megakaryocytic colonies (CFU-MK). The effects of 0.5 μM JAK inhibitor (ruxolitinib, Selleckchem) or 10 μM LY294002 (PI3K inhibitor, Selleckchem) were tested in these conditions. CFU-MK derived colonies were enumerated at day 10 after labeling by an indirect immuno-alkaline phosphatase staining technique using an anti-CD41a monoclonal antibody (Becton Dickinson, clone HIP8), as previously described [54]. Culture dishes were entirely scanned under an inverted microscope at $\times 4$ or $\times 10$.

Antibodies

Conjugated monoclonal antibodies against CD34-FITC (#560942), CD42-PE (#555473), CD41-APC (#559777), CD56-APC (#555518), CD14-FITC (#555397), CD3-PerCP (#552851), CD19-PE (#555413), CD38-PE (#560981), and CD90-APC (#559869) (Becton Dickinson) were used for cell sorting on an Influx flow cytometer (Becton Dickinson) and characterization of hematopoietic cells analyzed on a FACS Canto I (Becton Dickinson).

Western blot analysis

CD34⁺ cells from normal donors and patients were cultured in serum-free medium supplemented with 25 ng/mL SCF and 10 ng/mL TPO to induce MK differentiation. MK cells (CD41⁺CD42⁺) were sorted on day 9, starved for 16–18 h in serum-free medium without insulin-transferrin in the presence of 0.5 μM ruxolitinib or not, then re-stimulated with TPO (10 ng/mL). Each sample was lysed and analyzed by Western blotting. Polyclonal antibodies against phosphorylated forms of STAT1 (Tyr701)(#9167), STAT3 (Tyr705) (#9131), STAT5 (Tyr694)(#9351), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (#9101), and AKT (Ser473) (#9271) (Cell signaling) were used to assess the signaling pathways. Monoclonal anti-β-Actin antibody (Sigma) (#A2228) was used to check the loading. Membranes were revealed using a luminescent image analyzer (Image Quant LAS 4000, GE healthcare).

Acknowledgements This work was funded by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (Thrombocytosis, WV), the Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée HR 2016, 2019), the Fondation Laurette Fugain (WV, IP), INCA PLBIO 2016 (IP), by grant “Taxe d'apprentissage” Gustave Roussy—2016 (LS and MEK) and from the INSERM. Labex GR-Ex (IP, WV) is funded by the program “Investissements d'avenir.” Support to SNC was from

Fondation contre le cancer, Salus Sanguinis Action de recherche concertée (ARC) 16/21-073 and WelBio F 44/8/5—MCF/UG—10955. MEK was supported by the SFH (Société française d'hématologie), XC and AT were supported by the university Paris-Diderot (MENRT grant), MM by la Ligue Nationale contre le Cancer, Gustave Roussy Foundation and SFH. GRM was a recipient from allocations doctorales sur domaines cibles (ARDoc, Ile-de-France region). GV was supported by a PhD aspirant fellowship of the Fonds Nationaux de la Recherche Scientifique, Belgium. We want to thank the platforms of bioinformatic (Khadija M Diop, Guillaume Meurice and Marc Deloger) and flow cytometry and Edwige Leclercq, Marie-Hélène Courtier for CALR sizing analysis.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144–8.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779–90.
- Cabagnols X, Favale F, Pasquier F, Messaoudi K, Defour JP, Ianotto JC, et al. Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood*. 2016;127:333–42.
- Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127:325–32.
- Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3:e270.
- Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369:2379–90.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369:2391–405.
- Cabagnols X, Defour JP, Ugo V, Ianotto JC, Mossuz P, Mondet J, et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocythemia: relevance for disease evolution. *Leukemia*. 2015;29:249–52.
- Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, et al. Type 1 versus type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol*. 2014;89:E121–4.
- Eder-Azanza L, Navarro D, Aranaz P, Novo FJ, Cross NC, Vizmanos JL. Bioinformatic analyses of CALR mutations in myeloproliferative neoplasms support a role in signaling. *Leukemia*. 2014;28:2106–9.
- Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, Di Buduo CA, Milanesi C, Cavalloni C, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30:431–8.
- Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127:1307–16.
- Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127:1325–35.
- Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, Perales-Paton J, Rosen EA, Ko A, et al. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. *Cancer Discov*. 2016;6:368–81.
- Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016;127:1317–24.
- Balligand T, Achouri Y, Pecquet P, Gaudray G, Colau D, Hug E, et al. Knock-in of Murine Calr del52 induces essential thrombocythemia with slow-rising dominance in mice and reveals key role of Calr Exon9 in Cardiac Development. *Leukemia*. 2020;34:510–21.
- Li J, Prins D, Park HJ, Grinfeld J, Gonzalez-Arias C, Loughran S, et al. Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage. *Blood*. 2018;131:649–61.
- Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiunten A, et al. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia*. 2017;31:1136–44.
- Andrikovics H, Krahling T, Balassa K, Halm G, Bors A, Koszarska M, et al. Distinct clinical characteristics of myeloproliferative neoplasms with calreticulin mutations. *Haematologica*. 2014;99:1184–90.
- Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood*. 2014;123:1552–5.
- Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123:1544–51.
- Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. *Leukemia*. 2014;28:1568–70.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391–405.
- Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2014;28:1407–13.
- Allen C, Lambert JR, Linch DC, Gale RE. X chromosome inactivation analysis reveals a difference in the biology of ET patients with JAK2 and CALR mutations. *Blood*. 2014;124:2091–3.
- Dupont S, Masse A, James C, Teyssandier I, Lecluse Y, Larbret F, et al. The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007;110:1013–21.
- Scott LM, Scott MA, Campbell PJ, Green AR. Progenitors homozygous for the V617F mutation occur in most patients with polycythemia vera, but not essential thrombocythemia. *Blood*. 2006;108:2435–7.
- Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118:1723–35.

29. Kjaer L, Holmstrom MO, Cordua S, Andersen MH, Svane IM, Thomassen M, et al. Sorted peripheral blood cells identify CALR mutations in B- and T-lymphocytes. *Leuk Lymphoma*. 2018;59:973–7.
30. Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Masse A, Godin I, Le Couedic JP, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2007;109:71–7.
31. Nam AS, Kim KT, Chaligne R, Izzo F, Ang C, Taylor J, et al. Somatic mutations and cell identity linked by Genotyping of Transcriptomes. *Nature*. 2019;571:355–60.
32. Rodriguez-Meira A, Buck G, Clark SA, Povinelli BJ, Alcolea V, Louka E, et al. Unravelling intratumoral heterogeneity through high-sensitivity single-cell mutational analysis and parallel RNA sequencing. *Mol Cell*. 2019;73:1292–305. e8.
33. Anand S, Stedham F, Beer P, Gudgin E, Ortmann CA, Bench A, et al. Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011;118:177–81.
34. James C, Mazurier F, Dupont S, Chaligne R, Lamrissi-Garcia I, Tulliez M, et al. The hematopoietic stem cell compartment of JAK2V617F-positive myeloproliferative disorders is a reflection of disease heterogeneity. *Blood*. 2008;112:2429–38.
35. Kent DG, Li J, Tanna H, Fink J, Kirschner K, Pask DC, et al. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion. *PLoS Biol*. 2013;11:e1001576.
36. Saint-Martin C, Leroy G, Delhommeau F, Panelatti G, Dupont S, James C, et al. Analysis of the ten-eleven translocation 2 (TET2) gene in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2009;114:1628–32.
37. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015;372:601–12.
38. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009;360:2289–301.
39. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123:2220–8.
40. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Boveri E, Arcaini L, et al. A prospective study of 338 patients with polycythemia vera: the impact of JAK2 (V617F) allele burden and leukocytosis on fibrotic or leukemic disease transformation and vascular complications. *Leukemia*. 2010;24:1574–9.
41. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, Bordoni R, Casetti I, Milanesi C, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013;121:4388–95.
42. Barosi G, Rosti V, Bonetti E, Campanelli R, Carolei A, Catarsi P, et al. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis. *PLoS ONE*. 2012;7:e35631.
43. Campbell PJ, Scott LM, Buck G, Wheatley K, East CL, Marsden JT, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945–53.
44. Kollmann K, Warsch W, Gonzalez-Arias C, Nice FL, Avezov E, Milburn J, et al. A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation. *Leukemia*. 2017;31:934–44.
45. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendling F. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*. 2002;100:3495–503.
46. Lau WW, Hannah R, Green AR, Gottgens B. The JAK-STAT signaling pathway is differentially activated in CALR-positive compared with JAK2V617F-positive ET patients. *Blood*. 2015;125:1679–81.
47. Di Buduo CA, Abbonante V, Marty C, Moccia F, Rumi E, Pietra D, et al. Defective interaction of mutant calreticulin and SOCE in megakaryocytes from patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2020;135:133–44.
48. Elf S, Abdelfattah NS, Baral AJ, Beeson D, Rivera JF, Ko A, et al. Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. *Blood*. 2018;131:782–6.
49. Pronier E, Cifani P, Merlinsky TR, Berman KB, Somasundara AVH, Rampal RK, et al. Targeting the CALR interactome in myeloproliferative neoplasms. *JCI Insight*. 2018;3:e122703.
50. Mondet J, Park JH, Menard A, Marzac C, Carillo S, Pourcelot E, et al. Endogenous megakaryocytic colonies underline association between megakaryocytes and calreticulin mutations in essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2015;100:e176–8.
51. Gekas C, Graf T. CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*. 2013;121:4463–72.
52. Sanjuan-Pla A, Macaulay IC, Jensen CT, Woll PS, Luis TC, Mead A, et al. Platelet-biased stem cells reside at the apex of the hematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature*. 2013;502:232–6.
53. Kjaer L, Cordua S, Holmstrom MO, Thomassen M, Kruse TA, Pallisgaard N, et al. Differential dynamics of CALR mutant Allele burden in myeloproliferative neoplasms during Interferon Alfa Treatment. *PLoS ONE*. 2016;11:e0165336.
54. Debili N, Coulombel L, Croisille L, Katz A, Guichard J, Breton-Gorius J, et al. Characterization of a bipotent erythromegakaryocytic progenitor in human bone marrow. *Blood*. 1996;88:1284–96.

RESEARCH BRIEF

In Vivo Monitoring of Polycythemia Vera Development Reveals Carbonic Anhydrase 1 as a Potent Therapeutic Target

Shohei Murakami^{1,2,3}, Vilma Barroca^{1,2,3}, Leïla Perié^{4,5}, Anne Bravard^{1,2,3}, Jacqueline Bernardino-Sgherri^{1,2,3}, Amandine Tisserand⁶, Caroline Devanand^{1,2,3}, Valérie Edmond⁶, Aurélie Magniez^{4,5}, Sabrina Tenreira Bento^{4,5}, Claire Torres^{1,2,3}, Florence Pasquier⁷, Isabelle Plo⁶, William Vainchenker⁶, Jean-Luc Villeval⁶, Paul-Henri Roméo^{1,2,3}, and Daniel Lewandowski^{1,2,3}



Downloaded from <https://aacrjournals.org/bloodcancerdiscov/article-pdf/3/4/285/3183747/285.pdf> by Institut Gustave Roussy user on 16 August 2022

ABSTRACT

Current murine models of myeloproliferative neoplasms (MPNs) cannot examine how MPNs progress from a single bone marrow source to the entire hematopoietic system. Thus, using transplantation of knock-in JAK2^{V617F} hematopoietic cells into a single irradiated leg, we show development of polycythemia vera (PV) from a single anatomic site in immunocompetent mice. Barcode experiments reveal that grafted JAK2^{V617F} stem/progenitor cells migrate from the irradiated leg to nonirradiated organs such as the contralateral leg and spleen, which is strictly required for development of PV. Mutant cells colonizing the nonirradiated leg efficiently induce PV in nonconditioned recipient mice and contain JAK2^{V617F} hematopoietic stem/progenitor cells that express high levels of carbonic anhydrase 1 (CA1), a peculiar feature also found in CD34⁺ cells from patients with PV. Finally, genetic and pharmacologic inhibition of CA1 efficiently suppresses PV development and progression in mice and decreases PV patients' erythroid progenitors, strengthening CA1 as a potent therapeutic target for PV.

SIGNIFICANCE: Follow-up of hematopoietic malignancies from their initiating anatomic site is crucial for understanding their development and discovering new therapeutic avenues. We developed such an approach, used it to characterize PV progression, and identified CA1 as a promising therapeutic target of PV.

¹CEA-INSERM UMR1274, Institut de Radiobiologie Cellulaire et Moléculaire (iRCM), Institut de Biologie François Jacob (IBFJ), Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), CEA, Fontenay aux Roses, France. ²Université Paris Diderot, Paris, France. ³Université Paris Saclay, Gif-sur-Yvette, France. ⁴Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR168, Paris, France. ⁵Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, France. ⁶University Paris-Saclay, INSERM UMR 1270, Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁷INSERM, UMR 1287, Département d'hématologie, Gustave Roussy, Villejuif, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Blood Cancer Discovery Online (<https://bloodcancerdiscov.aacrjournals.org/>).

Current address for S. Murakami: Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Department of Gene Expression Regulation, Tohoku University, Japan.

Corresponding Authors: Daniel Lewandowski, Direction de la Recherche Fondamentale (DRF), CEA, 18 Route du Panorama, Fontenay-aux-Roses 92265, France. Phone: 3301-4654-8604; E-mail: daniel.lewandowski@cea.fr; and Paul-Henri Roméo, paul-henri.romeo@cea.fr

Blood Cancer Discov 2022;3:285–97

doi: 10.1158/2643-3230.BCD-21-0039

©2022 American Association for Cancer Research

INTRODUCTION

Hematopoietic malignancies have been modeled using transgenic and knock-in models with or without bone marrow (BM) transplantation of mutated hematopoietic cells (1, 2). These models result in the expression of the mutated gene(s) in all targeted hematopoietic cells and in all organs that contain these hematopoietic cells. Thus, how a hematopoietic malignancy can progressively invade hematopoietic organs from a defined single anatomic site, as it occurs in patients, has not been studied in immunocompetent mice, calling for the development of new experimental approaches.

JAK2^{V617F} mutation within blood-forming cells is found in more than 90% of patients with polycythemia vera (PV; ref. 3) and in more than 50% of patients with essential thrombocythemia (4) and primary myelofibrosis (5). Mouse models of these myeloproliferative neoplasms (MPNs) have been useful in characterizing JAK2 inhibitors or other drugs that were subsequently employed for MPN treatment (6). Unfortunately, except for use of IFN α (7), none of these treatments efficiently targets the malignant clone and after an initial beneficial response, many patients lose responsiveness to these inhibitors (8), and/or develop adverse effects (9), indicating the urgent need for new therapeutic targets.

We have developed an *in vivo* approach to study the progression of PV from a single irradiated anatomic site to the entire hematopoietic system and, in doing so, we show an essential role of the spleen and a previously unsuspected major contribution by carbonic anhydrase 1 (CA1) to PV development.

RESULTS

An Approach to Following PV Progression in Immunocompetent Mice

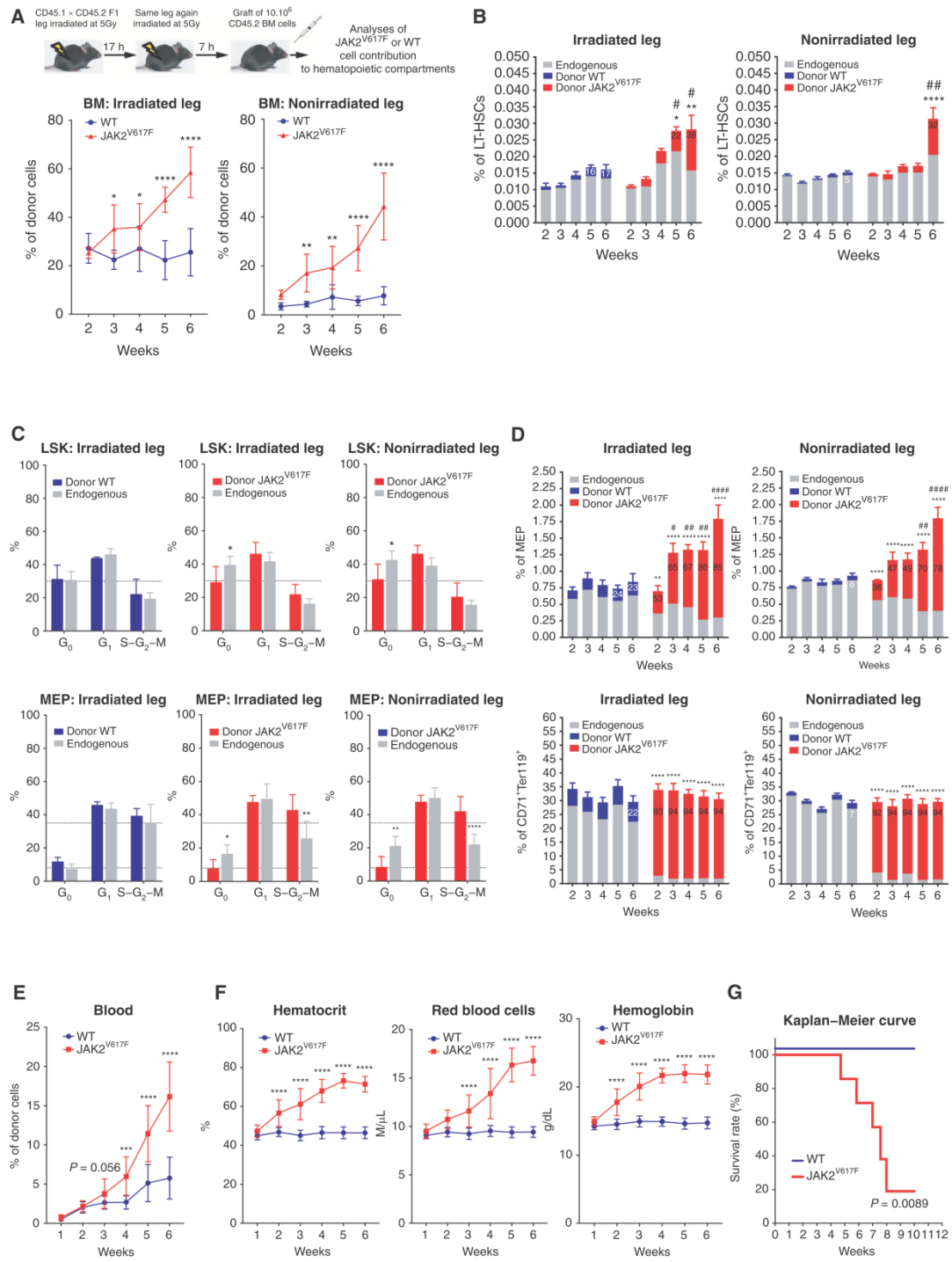
Sequential irradiation (2 \times 5 Gy with 17-hour rest) of a single C57BL/6J mouse leg resulted in decreased BM cellularity and in decreased numbers of long-term hematopoietic stem cells (LT-HSCs) only in the irradiated leg 7 hours after the second irradiation (Supplementary Fig. S1A–S1C). Transplantation of wild-type (WT) BM cells led to a stable but largely restricted engraftment of WT hematopoietic cells within the irradiated leg and to a stable blood chimerism during weeks 4 to 20 (Fig. 1A; Supplementary Fig. S1D and S1E), thus precluding an adoptive transfer of WT BM cells. In contrast, transplantation of JAK2^{V617F} BM cells from knock-in mice resulted in a progressive increase of JAK2^{V617F} hematopoietic cells in both legs (Fig. 1A) without

any significant change in their BM cellularity (Supplementary Fig. S1F). Numbers of JAK2^{V617F} LT-HSCs, multipotent progenitors (MPP) and granulocyte–monocyte progenitors (GMP; Fig. 1B; Supplementary Fig. S1G and S1H for gating strategies) were increased in the BM of irradiated and nonirradiated legs by 6 weeks after transplantation, indicating proliferation and/or differentiation of JAK2^{V617F} LT-HSCs and of JAK2^{V617F} MPP and GMP compartments. In both legs and only after transplantation of JAK2^{V617F} BM cells, the percentages of endogenous Lin[–]Sca⁺Kit⁺ (LSK) cells and megakaryocyte–erythroid progenitors (MEP) in G₀ phase and of JAK2^{V617F} MEP in S–G₂–M phase increased (Fig. 1C). This was associated, in both legs and as early as two weeks after transplantation, with an expansion of JAK2^{V617F} MEP at the expense of endogenous MEP and an almost full contribution of JAK2^{V617F} cells to the CD71⁺Ter119⁺ erythroid cell compartment without expansion of this compartment (Fig. 1D; Supplementary Fig. S1H and S1I for comparison with CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells). Mice with a single-irradiated-leg transplanted with JAK2^{V617F} BM cells developed PV syndrome as assessed by progressively increased JAK2^{V617F} cell burden and red blood parameters (Fig. 1E and F) followed by death of 80% of mice 9 weeks posttransplantation (Fig. 1G). Altogether, these results indicate that this single-irradiated-leg mouse model can be used to study JAK2^{V617F} hematopoietic cell dynamics associated with PV progression in an immunocompetent mouse model.

JAK2^{V617F} LSK Cells from the Irradiated Leg Colonize the Nonirradiated Leg

Chemokine detection assays undertaken one week after BM transplantation revealed increased levels of chemokines such as MMP9, CCL6, soluble V-CAM-1 and I-CAM-1, known to be involved in hematopoietic stem and progenitor cell (HSPC) mobilization (10, 11). These increases were observed only in the irradiated leg BM supernatant and only after JAK2^{V617F} BM transplantation (Supplementary Fig. S2A). Increased chemokine levels were associated with increased numbers of circulating JAK2^{V617F} HSPC starting 4 days after transplantation (Fig. 2A) and suggested that JAK2^{V617F} HSPC grafted into the irradiated leg could migrate to nonirradiated organs such as the nonirradiated leg. To test this hypothesis, JAK2^{V617F} LSK cells were transduced with a lentiviral barcode library (12) at a MOI of 1 and transplanted into the irradiated leg of recipient mice (Fig. 2B, top scheme; Supplementary Fig. S2B and S2C). Of note, the number of donor WT LSK cells in the nonirradiated leg was too low (chimerism lower than 5%, see Fig. 1A and B) to sort these cells and to perform bar-coded analysis. As expected, PV development in mice transplanted with

Figure 1. Follow up of PV development in mice. **A**, Experimental design (top) and kinetics of transplanted WT or JAK2^{V617F} BM cells contribution to total BM hematopoietic cells in the irradiated and nonirradiated legs (bottom). **B**, Kinetics of WT or JAK2^{V617F} cells contribution to the long-term hematopoietic stem cell (LT-HSC). **C**, Cell-cycle analysis of WT (left, blue) and JAK2^{V617F} (middle and right, red) Lin[–]cKit⁺Sca⁺ (LSK) cells (top) and megakaryocyte–erythroid progenitors (MEP, bottom) and their endogenous counterparts (grey) in the irradiated and nonirradiated legs 3 weeks after transplantation. **D**, Kinetics of WT or JAK2^{V617F} cells contribution to MEP (top) and to CD71⁺Ter119⁺ mature erythroid (bottom) compartments in the irradiated and nonirradiated legs. **E**, Kinetics of peripheral blood cells after transplantation of JAK2^{V617F} or WT BM cells in a single irradiated leg. **F**, Kinetics of blood parameters after transplantation of JAK2^{V617F} or WT BM cells in a single irradiated leg. **G**, Survival curve of mice after transplantation of JAK2^{V617F} or WT BM cells in a single irradiated leg. Data are mean \pm SEM from three independent experiments (n = 8–12 mice). Significance was assessed using unpaired two-tailed t test and two-way ANOVA followed by post hoc analysis (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001; **B** and **D**, asterisks denote P-value comparing chimerism (% of GFP cells as indicated with the number (mean)) between Donor JAK2 vs Donor WT, and # denotes P-value comparing the % of cells studied from BM (irradiated and nonirradiated leg) of mice transplanted with WT or JAK2^{V617F} cells).



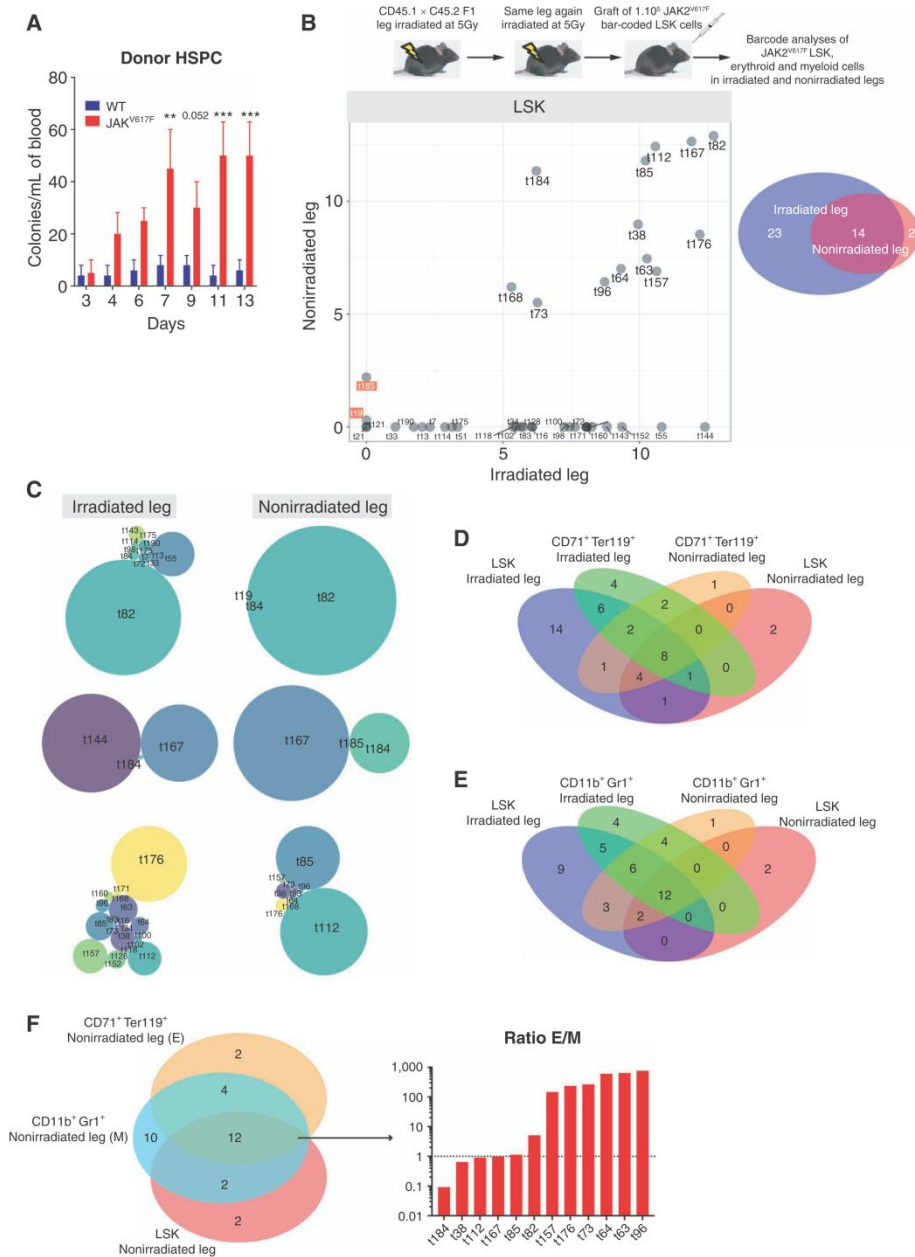


Figure 2. JAK2^{V617F} LSK from irradiated leg colonize the nonirradiated leg. **A**, Kinetics of donor-derived WT or JAK2^{V617F} colony-forming unit per mL of blood from mice transplanted with WT or JAK2^{V617F} BM cells in a single irradiated leg. Data are mean ± SEM. Significance was assessed using unpaired two-tailed *t* test and two-way ANOVA followed by *post hoc* analysis (**, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001). **B**, Experimental design (top) and frequency of JAK2^{V617F} LSK bar-coded clones in the nonirradiated (*y*-axis) and irradiated (*x*-axis) legs (bottom left), the barcode frequency is log transformed and bar-coded clones discussed in the main text are highlighted. Venn diagram of bar-coded JAK2^{V617F} LSK clones in the nonirradiated and irradiated legs (*n* = 3, bottom right). **C**, Representative distribution of bar-coded JAK2^{V617F} LSK clones in the nonirradiated and irradiated legs for each mouse (*n* = 3). **D**, Venn diagram of bar-coded JAK2^{V617F} LSK and CD71⁺Ter119⁺ erythroid clones in the nonirradiated and irradiated legs (*n* = 3). **E**, Venn diagram of bar-coded JAK2^{V617F} LSK and CD11b⁺Gr1⁺ myeloid clones in the nonirradiated and irradiated legs (*n* = 3). **F**, Venn diagram of bar-coded JAK2^{V617F} LSK, CD71⁺Ter119⁺ erythroid and CD11b⁺Gr1⁺ myeloid clones in the nonirradiated leg (left) and histograms showing the ratio of distribution of erythroid (E) and myeloid (M) bar-coded clones (right).

JAK2^{V617F} LSK cells was slower than in mice transplanted with JAK2^{V617F} BM as shown by the delayed increase of blood parameters (compare Fig. 1F with Supplementary Fig. S2D). As the single-irradiated-leg mouse model does not lead to aplasia, analysis of bar-coded JAK2^{V617F} LSK cells could be performed as early as 11 weeks after their transplantation. This analysis showed that the number of bar-coded clones detected in the irradiated leg was more than two-fold higher than in the nonirradiated leg (Fig. 2B; Supplementary Fig. S2E). Of note, all except two clones (t19 and t185) present in the nonirradiated leg were present in the irradiated leg (Fig. 2B). Interestingly, while the bar-coded JAK2^{V617F} LSK found in the irradiated leg differed in their number and relative proportion in the 3 mice studied (Fig. 2C, left), only one or two bar-coded JAK2^{V617F} LSK were dominating in the nonirradiated legs of these mice (Fig. 2C, right). These results suggested different dynamics of JAK2^{V617F} LSK clone proliferation and/or differentiation in the irradiated and nonirradiated legs. Accordingly, in the nonirradiated leg, 67% bar-coded CD71⁺Ter119⁺ erythroid cells shared barcodes with JAK2^{V617F} LSK cells (Fig. 2D; Supplementary Fig. S2E), whereas only 50% of bar-coded myeloid cells had corresponding bar-coded JAK2^{V617F} LSK cells (Fig. 2E; Supplementary Fig. S2E). In addition, in the nonirradiated leg, 75% of bar-coded JAK2^{V617F} LSK gave rise to bar-coded erythroid and myeloid progeny but with higher frequencies of erythroid cells (Fig. 2F; Supplementary Fig. S2E). Altogether, these results showed that JAK2^{V617F} LSK cells from the irradiated leg could colonize the nonirradiated leg where they contributed largely to erythroid cells production.

The Spleen Is Necessary for PV Development through Amplification of the JAK2^{V617F} Erythroid Compartment

Although splenomegaly is associated with MPN (13), the role of the spleen in the development of these neoplasms is incompletely defined (14). Bearing in mind that mouse but not human spleen is a full-fledged hematopoietic organ, we examined the spleen in the mouse model used. Spleen weight and size increased after transplantation of JAK2^{V617F} hematopoietic cells (Fig. 3A) with an increased JAK2^{V617F} chimerism in splenic white blood cells (Supplementary Fig. S3A). In the spleen, JAK2^{V617F} cells increased their contribution to the LSK compartment without any overall significant increase of this compartment (Fig. 3B). As in BM, the splenic MEP compartment increased due to high contribution of JAK2^{V617F} MEP but, in contrast to BM, this increase was associated with specific pronounced expansion of the CD71⁺Ter119⁺ erythroid compartment as early as two weeks after transplantation (compare Fig. 3C with 1D for CD71⁺Ter119⁺ erythroid cells and Supplementary Fig. S3B for CD11b⁺Gr1⁺ myeloid cells). These results suggested that the spleen greatly increased red blood cell production in this mouse model of PV. Barcode analysis showed that more than 90% of LSK barcode clones present in the irradiated and nonirradiated legs were also present in the spleen (Fig. 3D) suggesting that these clones migrated from the irradiated leg into the nonirradiated leg and the spleen. Compared with the nonirradiated leg, the spleen contained 2× more erythroid clones and 1.3× more myeloid clones (Fig. 3E, top schemes) but

amplification of erythroid or myeloid clones common to both spleen and nonirradiated leg was much more frequent for myeloid than for erythroid clones (Fig. 3E, histograms), suggesting that the spleen harbored more erythroid clones and preferentially amplified myeloid clones. To unravel the role of the spleen in PV development, mice were splenectomized one week after transplantation of JAK2^{V617F} hematopoietic cells, that is, when the spleen began to be colonized by JAK2^{V617F} cells (Supplementary Fig. S3C). The splenectomized mice did not die prematurely, suggesting escape from PV syndrome (Fig. 3F). These mice showed normal red blood parameters (Fig. 3G) and a blood chimerism similar to that in mice transplanted with WT cells when followed up to 16 weeks after transplantation (Fig. 3H). Furthermore, in nonhematopoietic organ of these splenectomized mice such as the liver, a decreased number of JAK2^{V617F} erythroid cells was found (Supplementary Fig. S3D). These observations suggested that splenectomy rescue these mice from PV. Nevertheless, at 26 weeks, these mice showed a high contribution by JAK2^{V617F} cells to both myeloid-, erythroid- (Fig. 3I) and LT-HSC (Fig. 3J) compartments associated with a decreased BM cellularity in both legs (Fig. 3K) indicating that these mice survived with an almost completely mutant cell-derived hematopoiesis. Similar results were obtained when splenectomy was performed 2 weeks after transplantation; that is, after detectable mutant cell hematopoiesis in the nonirradiated leg (Supplementary Fig. S3E–S3H). These results indicate that despite the persistence and amplification of JAK2^{V617F} cells in bones, splenectomy hinders the amplification of the erythroid compartment and the development of PV.

Inhibition of CA1 Suppresses PV Progression

Evolution and/or selection of migrating JAK2^{V617F} clones were functionally studied by secondary transplantation. Whereas 20% of nonconditioned immunocompetent mice transplanted with BM from the irradiated leg of primary JAK2^{V617F} recipient mice developed PV, up to 66% of mice transplanted with BM from the nonirradiated leg developed PV (Fig. 4A), indicating that JAK2^{V617F} LSK cells that have migrated and nested within the nonirradiated leg exhibited increased fitness for a nonirradiated environment. We thus searched for the molecular basis of this increased fitness, with the hypothesis that such selection might mirror observed clonal dominance acquisition of mutated HSCs during the natural history of human disease (15). To obtain further mechanistic insights, we compared transcriptomic profiles of sorted JAK2^{V617F} HSPC and their reciprocal endogenous WT HSPC in the nonirradiated leg (Supplementary Fig. S4A). Gene-set enrichment analysis revealed the downregulation of genes associated with signaling by tyrosine kinases and activation of genes associated with oxidative phosphorylation and erythrocytes oxygen uptake and carbon dioxide release (Supplementary Fig. S4B and S4C). One of the most differentially expressed genes was the CA1 gene (*Car1*) gene and, indeed, high *Car1* mRNA levels were detected in JAK2^{V617F} HSPC from both legs with the highest *Car1* mRNA levels in the nonirradiated leg (Fig. 4B; Supplementary Fig. S5A). This high mRNA level was associated

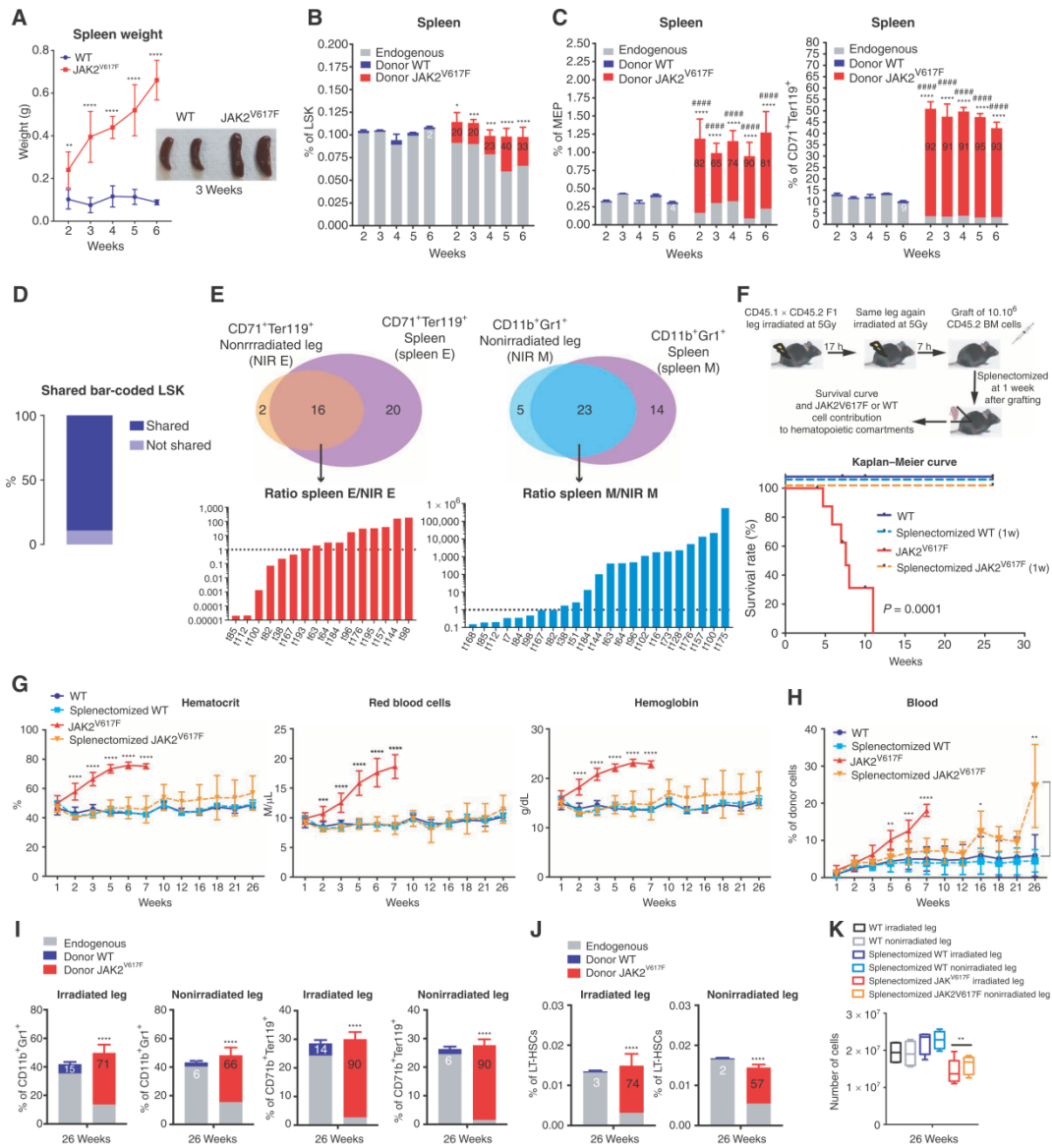


Figure 3. The spleen is necessary for PV development through amplification of the JAK2^{V617F} erythroid compartment. **A**, Kinetics of spleen weight (left) and pictures of spleens 3 weeks after transplantation of WT and JAK2^{V617F} BM cells (right). **B**, Kinetics of WT or JAK2^{V617F} cells contribution to the LSK compartment. **C**, Kinetics of WT or JAK2^{V617F} cells contribution to the megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP) and the CD71⁺Ter119⁺ erythroid compartments in the spleen. **D**, Percentage of JAK2^{V617F} LSK bar-coded clones shared between the irradiated leg, the nonirradiated leg, and the spleen. **E**, Venn diagrams of bar-coded CD71⁺Ter119⁺ erythroid (left top) and CD11b⁺Gr1⁺ myeloid clones (right top) in the nonirradiated leg and in the spleen and histograms showing the ratio of distribution of bar-coded erythroid (left bottom) and myeloid (right bottom) clones in the nonirradiated leg (NIR E, NIR M) and in the spleen (spleen E, spleen M; n = 3). **F**, Experimental design (top) and survival curve (bottom) of mice after splenectomy one week after transplantation of JAK2^{V617F} or WT BM cells in a single irradiated leg. **G**, Kinetics of blood parameters in mice after splenectomy 1 week after transplantation of JAK2^{V617F} or WT BM cells in a single irradiated leg. **H**, Kinetics of blood cell chimerism in mice after splenectomy 1 week after transplantation of JAK2^{V617F} or WT BM cells in a single irradiated leg. **I**, JAK2^{V617F}, WT and endogenous cells contributions to the irradiated and nonirradiated legs to the CD11b⁺Gr1⁺ myeloid and the CD71⁺Ter119⁺ erythroid compartments. **J**, JAK2^{V617F}, WT and endogenous cells contributions to the irradiated and non-irradiated legs to the LT-HSC compartment 26 weeks after transplantation. **K**, Total hematopoietic cell number in the irradiated and nonirradiated legs 26 weeks after transplantation. Data are mean ± SEM from 8 to 12 mice. Significance was assessed using unpaired two-tailed t test and two-way ANOVA followed by *post hoc* analysis (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001; ****, P < 0.0001; **B** and **C**, asterisks denote chimerism, and # denotes percentage of cells).

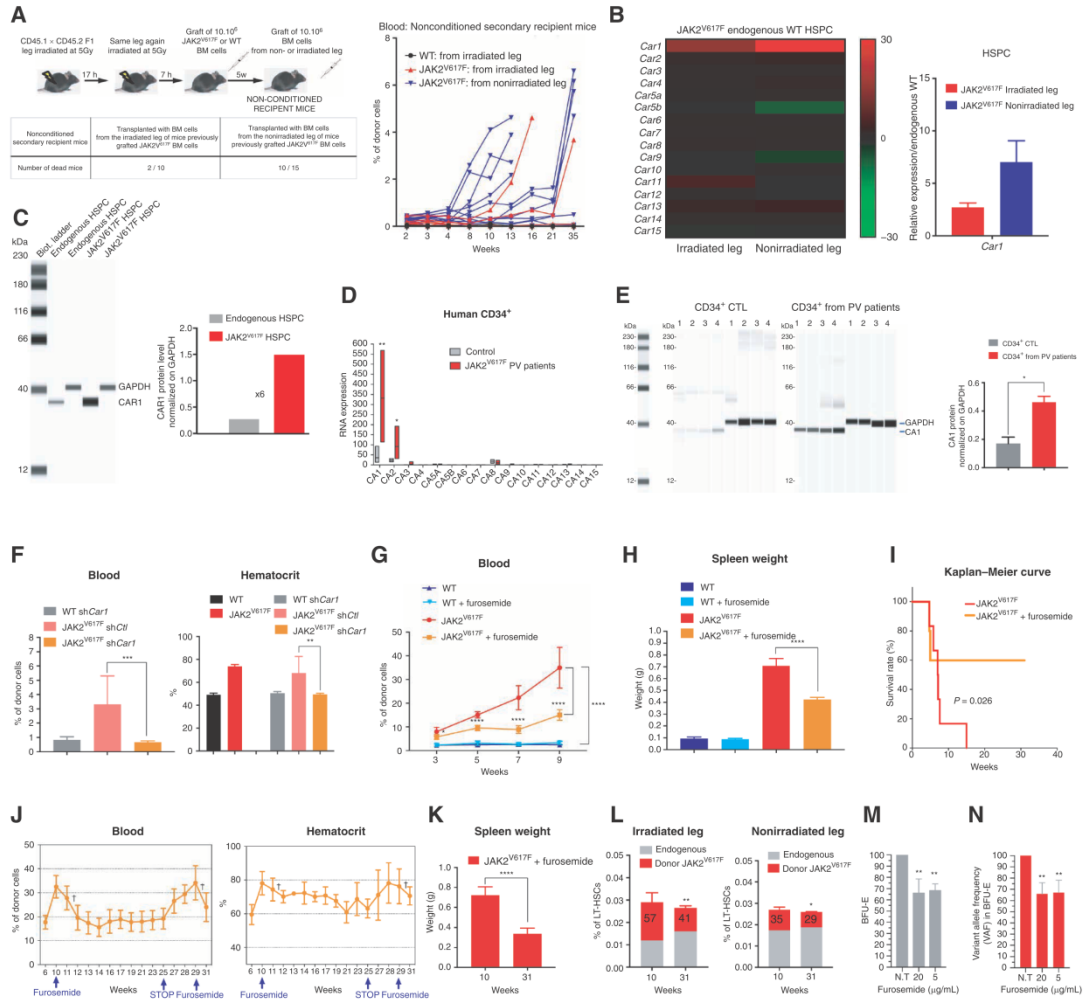


Figure 4. Genetic and pharmacologic inhibition of CA1 suppresses PV progression. **A**, Experimental design (top left), mortality trends after the secondary transplantations (bottom left) and kinetics of blood chimerism in secondary recipients transplanted with BM from the irradiated leg or the nonirradiated leg of primary mice transplanted with JAK2^{V617F} or WT BM cells (right). **B**, Heat map of all members of the CA family (JAK2^{V617F} HSPC vs. endogenous HSPCs; left) and relative mRNA levels of CA1 in HSPCs from irradiated and nonirradiated legs 6 weeks after transplantation of JAK2^{V617F} BM cells (right; *n* = 3–6). **C**, CAR1 protein expression level in HSPCs of the nonirradiated leg (left) normalized against GAPDH protein levels (right). **D**, mRNA level of all CA isoforms in human CD34⁺ cells from control and patients with JAK2^{V617F} PV (*n* = 4). **E**, CA1 protein expression in human CD34⁺ cells from control and patients with JAK2^{V617F} PV (left) (*n* = 4) and CA1 expression level normalized against GAPDH expression level (right). **F**, Blood chimerism (left) and hematocrit (right) in mice transplanted with JAK2^{V617F} or WT LSK cells transduced with *Car1* or *Ct1* shRNA lentivirus in a single-leg-irradiated mice (*n* = 5). **G**, Kinetics of blood chimerism in mice transplanted with JAK2^{V617F} or WT BM cells and daily treated or not with furosemide at 20 mg/kg starting two weeks after transplantation (*n* = 8–12). **H**, Spleen weight 8 weeks after the beginning of furosemide treatment. **I**, Survival curve after furosemide treatment (*n* = 8–12). **J**, Blood chimerism (left) and hematocrit (right) after transplantation of JAK2^{V617F} BM cells followed by furosemide treatment that began at 10 weeks (wk 10), ceased at 25 weeks (wk 25), and began again at 29 weeks (wk 29; see arrows; *n* = 8–12). The crosses indicated nontreated mouse mortality. **K**, Spleen weight before furosemide treatment (10 weeks in **J**) and at the end of the sequential furosemide treatment (31 weeks in **J**). **L**, JAK2^{V617F} cells contribution to LT-HSCs in nonirradiated and irradiated legs before furosemide treatment (10 weeks in **J**) and at the end of the sequential furosemide treatment (31 weeks in **J**; *n* = 3–5). **M**, Effects of 5 and 20 μg/mL of furosemide on the percentages of BFU-E from CD34⁺ cells of patients with PV (*n* = 4). 100% is used as percentage of BFU-E in the absence of furosemide (N.T.). **N**, Relative percentage of JAK2^{V617F} VAF in the BFU-E after treatment with 5 and 20 μg/mL of furosemide. 100% is used as percentage of VAF in the BFU-E in the absence of furosemide (N.T.). Data are mean ± SEM. Significance was assessed using unpaired two-tailed *t* test and two-way ANOVA followed by *post hoc* analysis (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.0001).

Downloaded from <http://aacrjournals.org/bloodcancerdiscovery/article-pdf/3/4/285/3183747/285.pdf> by Institut Gustave Roussy user on 16 August 2022

with a high CAR1 protein level (Fig. 4C). In JAK2^{V617F} CD34⁺ progenitor cells from patients with PV, RNA-sequencing (RNA-seq) analysis showed that only *CA1* and *CA2* mRNA levels were increased with *CA1* mRNA levels being by far the highest (Fig. 4D). The increase of *CA1* mRNA level in CD34⁺ progenitor cells from patients with PV was validated by qRT-PCR (Supplementary Fig. S5B) and associated with a 4-fold increase of *CA1* protein level (Fig. 4E). To assess the contribution of CAR1 to PV development in mice, JAK2^{V617F} LSK cells were transduced with *Car1* shRNA or control shRNA lentiviruses and transplanted into the irradiated leg of recipient mice (Supplementary Fig. S5C, top scheme). Mice transplanted with control shRNA JAK2^{V617F} LSK cells displayed blood parameters associated with PV progression, whereas mice transplanted with *Car1* shRNA JAK2^{V617F} LSK cells showed no sign of the disease (Fig. 4F; Supplementary Fig. S5D and S5C, left and middle panels), except when nontransduced JAK2^{V617F} LSK cells were the most abundant (Supplementary Fig. S5C, bottom right panels). *Car1* shRNA used is a mix of 3 short hairpin RNAs (shRNA). As shRNAs are notorious for off-targets effects, we performed a shRNA rescue experiment to detect any off-target effects. JAK2^{V617F} Lin⁻c-Kit⁺ cells from BM of single-leg-irradiated mice transplanted with JAK2V617F BM cells were cotransduced with a lentivirus expressing control sh (sh*Ctl*) or sh 1 or sh2 or sh3 that target *Car1* mRNA and a lentivirus expressing a WT CAR1 protein (silent mutant CAR1 as SmCAR1) from a *Car1* cDNA containing silent mutations that impair the action of sh1, sh2, and sh3. Similar increases of JAK2^{V617F} BFU-E/CFU-E were obtained whatever shRNA expressed together with SmCAR1 (Supplementary Fig. S5E) and were associated with increased levels of CAR1 (Supplementary Fig. S5F) indicating the specificity and efficiency of the three shRNAs used. These findings prompted us to pharmacologically inhibit CAR1. Mice transplanted with JAK2^{V617F} BM cells received daily injections of furosemide, a specific CAR1 inhibitor currently used as a diuretic (16). Treatment at 20 mg/kg of furosemide resulted in decreased JAK2^{V617F} cell burden in blood (Fig. 4G), decreased spleen weight (Fig. 4H), and improved blood parameters (Supplementary Fig. S5G) and improved survival rates (Fig. 4I) when compared with untreated littermates transplanted with JAK2^{V617F} BM cells. Similar results were obtained by treating mice with another CAR1 inhibitor, acetazolamide (Supplementary Fig. S5H and S5I) but, for the remainder of this study, we used furosemide as its *K_i* for CAR1 is higher than the acetazolamide one (17). To determine whether furosemide might impede PV after its establishment, furosemide was injected daily into mice after disease onset. This treatment resulted in a rapid, stable, and furosemide-dependent decrease of JAK2^{V617F} cell burden in blood (Fig. 4J, left) associated with a decreased hematocrit (Fig. 4J, right) and spleen weight (Fig. 4K), increased survival of the treated mice and a significant decrease of JAK2^{V617F} LT-HSC contribution to the LT-HSC compartment (Fig. 4L). As furosemide is also a diuretic, we treated JAK2^{V617F} mice with spironolactone, a diuretic which displays no inhibition of CAR1 activity (18) and we found that spironolactone had no effect on the survival of mice with PV (Supplementary Fig. S5J) and PV-associated symptoms (Supplementary Fig. S5K). To

study the effect of furosemide at a dose within the range used for patients, mice transplanted with JAK2^{V617F} BM cells were daily injected with furosemide at 5 mg/kg. This treatment resulted in a therapeutic effect similar to the one obtained with 20 mg/kg (Supplementary Fig. S5L). Finally, furosemide treatment of CD34⁺ cells from patients with PV decreased the percentages of BFU-E (Fig. 4M) with preferential effect on JAK2^{V617F} CD34⁺ cells monitored by the decreased variant allele frequency in the BFU-E (Fig. 4N). Altogether, these results demonstrate that CAR1 is a potential therapeutic target for suppression of PV syndrome in this preclinical model and for PV patient erythroid progenitors through specific targeting of JAK2^{V617F} cells.

DISCUSSION

We have developed an *in vivo* approach that allows examination of the temporal progress of a mouse model of PV and that can also be used for other mouse models of hematopoietic malignancy. Local irradiation of a single leg has been shown to alter the dynamics of HSC homeostasis by increasing their homing to the site of irradiation with almost no HSC homing to the nonirradiated leg but this approach has never been used to study myeloproliferative or leukemia development. Finally, in contrast to TBI, this approach does not lead to aplasia and thus can be used to study donor hematopoiesis or MPN development at earlier time points.

Increased contribution of JAK2^{V617F} LT-HSCs to BM of irradiated and non-irradiated legs was not associated with decreased contribution of endogenous LT-HSCs but rather with an increased total number of LT-HSCs suggesting an absence of competition between endogenous and mutant LT-HSCs and/or the use of different niches by mutant and endogenous LT-HSCs (19, 20). In contrast to LT-HSCs, the JAK2^{V617F} MEP compartment gradually increased at the expense of the endogenous MEP compartment and this increase was associated with a higher proportion of cycling JAK2^{V617F} MEP and of endogenous WT MEP and LSK in G₀. This increased number of resting, endogenous WT cells was only observed after JAK2^{V617F} BM cells transplantation and might be related to chronic inflammation promoted by JAK2^{V617F} mature hematopoietic cells (21, 22). Finally, given that the mature erythroid compartment contained only mutant cells as early as two weeks after transplantation whereas percentages of endogenous and mutant MEP were equal at this time point, suggesting that erythroid differentiation of endogenous MEP might be decreased due to low levels of EPO in PV mouse models (23) and/or JAK2^{V617F} MEP might have a dramatically increased capacity to differentiate (24).

Barcode experiments showed that mutant cells present in the nonirradiated leg derived from the irradiated leg but the frequency of JAK2^{V617F} LSK clones present in irradiated and nonirradiated legs was different, thus highlighting a different microenvironment and/or postmigration selection of clones that could expand in the nonirradiated leg. Migration of most JAK2^{V617F} LSK was associated with their differentiation into erythroid and myeloid cells in the nonirradiated leg whereas one third of JAK2^{V617F} LSK clones present in the irradiated leg did not differentiate into mature cells, again

suggesting different dynamics of JAK2^{V617F} LSK clones in the irradiated and nonirradiated legs.

As expected, establishment of the PV phenotype was associated with splenomegaly. In contrast to observations in the legs, a high increase of mature mutant erythroid cells was found in the spleen and barcode experiments showed that one third of erythroid clones present in the spleen were not detected in either irradiated or nonirradiated leg. These results are in accordance with previous reports (25) and indicate that the spleen is necessary for the amplification of mutant erythroid cells in this PV mouse model. Indeed, splenectomy one or two weeks after transplantation normalized red blood cells parameters. However, in the bones of the splenectomized mice, hematopoiesis mainly derived from JAK2^{V617F} LT-HSCs and their differentiating or mature progeny indicating these mice had a JAK2^{V617F} hematopoiesis despite the extinction of the PV phenotype.

At present, the JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib has been approved for the treatment of patients with PV resistant/intolerant to hydroxyurea (5, 26), but this drug has no major effect on JAK2^{V617F} cell burden and some patients develop cytopenia (9) due to its nonselective effect on JAK2^{V617F} thus underscoring the need for new therapeutic targets in PV. In this study, genetic or pharmacologic inhibition of CAR1, the major CA isoform overexpressed in JAK2^{V617F} HSPC, resulted in an increased survival of mice associated with normalization of blood parameters of PV and of JAK2^{V617F} burden without any detrimental effect on normal hematopoiesis. In normal mature erythroid cells, CAR1 acts as a regulator of intracellular pH (27) and is a key protein for favoring O₂ intake in the lungs and its release in tissues. In contrast to many isoforms of carbonic anhydrase which play important role in cancer cells (24, 28, 29), little is known about functions of CAR1 in cancer. One possible role for CAR1 overexpression in JAK2^{V617F} PV might be to alter JAK2^{V617F} HSPC differentiation, as has been shown for enzymes that alter the cytosolic pH level to facilitate phosphorylation of proteins that, together with ncRNAs (30), regulate cellular differentiation.

Increased CA1 mRNA and CA1 protein levels were also found in CD34⁺ cells from PV patients with the JAK2^{V617F} mutation whereas mRNA levels of other CA isoforms were unchanged, with the exception of a slight increase of the CA2 mRNA level. Our study demonstrate that the CAR1 inhibitor furosemide not only impairs PV development and targets JAK2^{V617F} LT-HSCs in mice but also inhibits PV patients' BFU-E from their CD34⁺ cells, highlighting CAR1 as a potent and specific therapeutic target to treat human PV.

METHODS

Mice

Conditional floxed Jak2^{V617F} knock-in (KI) mice (23) were crossed with VavCre transgenic (TG) mice (31) to express the mutant *Jak2*^{V617F} gene in HSCs. To quantify allele burden in kinetic experiments, *Jak2*^{V617F} KI::VavCre mice were crossed with *Ubi*-GFP TG mice in the Gustave Roussy animal facilities. All these mice are under C57BL/6 (CD45.2) genetic background. For one-leg transplantation, F1 crossed C57BL/6.SJL/BoyJ (CD45.1) × C57BL/6J (CD45.2) mice were used as recipient mice. All mice were housed in a specific pathogen-free

section at an animal facility of CEA/DRF/IBFJ/iRCM (registration number A920322) according to the institutional guidelines and French Ministry of Agriculture's regulations. Animal experiment studies were approved by the French Government (APAFIS#20683) after reviewing by the institutional ethics committee.

One Leg Irradiation and Transplantation

Recipient mice were anesthetized with ketamine-xylazine and their right leg was fixed on a box with the left leg toward the opposite side of their body as shown in Supplementary Fig. S1. The box was put in the radiation field of a GSRD1 radiation equipment. The mouse body was shielded from irradiation with lead plates and the leg was irradiated 2 × 5 Gy with 17-hour rest. BM cells (10⁷) were intravenously transplanted into the irradiated mice 7 hours after the second irradiation. For barcode and shRNA experiments, 10⁵ transduced Lin⁻Sca1⁺cKit⁺ (LSK) hematopoietic cells were transplanted after isoflurane anesthesia.

Blood Analysis

Blood was collected and analyzed using a hemocytometer (CD3700, ABBOTT). The remaining blood was hemolyzed using an ammonium chloride solution (STEMCELL). The hemolyzed blood samples were stained with antibodies against CD45.1 (A20) and CD45.2 (104) and analyzed using flow cytometry to characterize blood chimerism.

Flow Cytometry Analysis

Recipient mice were sacrificed at the indicated time. BM cells (femur and tibia) of irradiated leg and of nonirradiated leg were harvested by flushing with 1 mL of PBS. After centrifugation, BM supernatants were collected and kept at -80°C with antiprotease (ROCHE) for chemokine analyses. BM cells were suspended in PBS; splenocytes or liver cells were also collected in PBS by crushing spleen or liver on a 70-μm filter, respectively. Before hemolysis, cells were stained with Ter119 (TER-119) and CD71 (C2) antibodies to characterize the erythroid compartment. The remaining cells were hemolyzed and stained for analyses of granulocytes, hematopoietic progenitor cells (HPC), and HSCs by using antibodies against CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CD11b (M1/70), Gr-1 (RB6-8C5), c-Kit (2B6), Sca-1 (D7 or E13-161.7), CD34 (RAM34 or MEC14.7), CD16/32 (93), CD48 (HM48-1), and CD150 (TC15-12F12.2). For HPCs and HSCs, cells were stained with Lineage Cell Detection Cocktail-Biotin (Miltenyi Biotec) revealed with PE-CF594 streptavidin antibody. For cell-cycle analyses, stained HSPCs were permeabilized with Cytofix/Cytoperm buffer following manufacturer's instructions (BD Biosciences) and labeled with anti-Ki67 antibody (SolA15) and Hoechst 33342. All antibodies were purchased from BioLegend, eBioscience, or BD Biosciences. Flow cytometry analyses were performed through FACS-Canto II (BD Biosciences) and LSR II (BD Biosciences), and cell sorting was conducted by using FACS Aria II (BD Biosciences). Analyses were performed with the FlowJo software (TRISTAR) and illustrated with the Prism7 software (GraphPad).

Mouse Colony Assay

One-hundred microliters of blood from recipient mice was collected and hemolyzed using an ammonium chloride solution (STEMCELL Technologies). The hemolyzed cells were plated in 3 mL of MethoCult GF M3434 (STEMCELL Technologies) on 35-mm dishes. The number of total and donor GFP⁺ colonies were counted at 14 days on an EVOS FL Auto Microscope (Thermo Fisher).

15,000 mouse Lineage negative (Lin⁻) cells BM cells from mice transplanted with JAK2^{V617F} (GFP⁺) BM cells were transduced for 72 hours with shRNA CTL or shRNAs targeting *Car1* and seeded in triplicate in 35-mm petri dishes in Methocult M3434 (STEMCELL

Technologies). After 8 days at 37°C, the number of total and GFP⁺ BFU-E colonies were scored using an EVOS FL Auto Imaging System (Thermo Fisher).

Patient Cell Purification and Colony Assay

Nine male and female patients (ages 40–90 years) were selected on PV diagnosis according to the 2016 iteration of the World Health Organization classification. Peripheral blood samples were collected from these patients with their written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the study was approved by the Ethics Committee from Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Dijon, Saint Louis Hospital, and Gustave Roussy; from Comité de Protection des Personnes Ile de France IV Institutional Review Board (IRB; agreement from the US Department of Health and Human Services IRB 00003835-protocol 2015/59-NICB) and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (authorization 915663). Control donor samples were obtained from donors after leukapheresis. Patient blood samples were collected between 2015 and 2021. Mononuclear cells were isolated by a Ficoll density gradient and CD34⁺ cells were purified by a double-positive magnetic cell sorting system (AutoMACS; Miltenyi Biotec) and stored at –140°C in DMSO.

Colony assay was performed on purified CD34⁺ cells from patients with JAK2^{V617F} PV. 1,000 human CD34⁺ cell preincubated or not for 1 hour 30 minutes with furosemide (5 and 20 µg/mL) in H5100 medium supplemented with 1% penicillin/streptomycin were seeded in triplicate in 35-mm petri dishes in Methocult H4435 (STEMCELL Technologies) supplemented or not with furosemide. Total and BFU-E colonies were scored after 12 to 20 days at 37°C. Individual colonies corresponding to the progeny of each progenitor were plucked using PBS 1×, lysed with proteinase K and DNA was genotyped for homozygous, heterozygous, or WT status by Taqman allelic discrimination on the ABI Prism GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystem, Thermo Fisher Scientific) as previously described (3).

Chemokines Assay

Chemokines from BM supernatant of irradiated and nonirradiated legs of recipient mice were analyzed with a proteome profiler mouse XL cytokine array following manufacturer's instructions (BIOTECHNE). Signal quantification was done with ImageQuant TL software (GE Healthcare).

Barcode Experiment

10⁵ Donor WT or JAK2^{V617F} LSK sorted cells were spin ocultated for 1 hour 30 minutes followed by 3 hours 30 minutes at 37°C with 10 µL of a vector library of 2,500 barcodes in a StemSpan SFEM medium (STEMCELL Technologies) with mSCF (50 ng/mL; R&D Systems) to obtain a multiplicity of infection (MOI) of 1. After removal of the virus medium, 1 × 10⁵ transduced LSK cells were transplanted into the irradiated leg of recipient mice. The transduction efficiency was in a range of 15% to 20%. After developing PV disease symptoms, mice were sacrificed and BM cells were separately collected from the irradiated leg and the nonirradiated leg, stained, and the donor-derived GFP⁺ cells were sorted from the indicated cell fractions. Genome DNA was extracted by lysing the cells with Proteinase K solution (Invitrogen) at 55°C for 2 hours. After the lysis, the DNA samples were split into technical duplicates. Amplification reaction, sequencing and barcode classification were performed at Curie Institute as described in Perié and colleagues (12).

Using a customized script in R (12), sample data were filtered (quality control and repeat use of barcodes, see extended data Fig. 2), normalized (to 10⁵ reads), and classified by tagging each barcode. Read counts were transformed using the hyperbolic arcsine

function that is similar to a logarithmic function but can accommodate barcode reads with a value of 0 as described (12). Resulting data have been graphed with a customized script in R from the R Graph Gallery.

Splenectomy and Secondary Transplantation

Recipient mice were irradiated on one leg, intravenously transplanted with 10⁷ donor WT or JAK2^{V617F} BM cells and splenectomized 1 or 2 week(s) after grafting by surgical intervention under isoflurane anesthesia. For secondary transplantation experiments, BM cells were separately harvested from the irradiated legs and non-irradiated legs of recipient mice 5 weeks after transplantation, then hemolyzed and transplanted at 10⁷ into secondary nonconditioned immunocompetent mice.

Hematoxylin and Eosin Coloration and Anti-GFP Immunostaining

Spleens were collected at indicated time and fixed in 4% PFA for 24 hours at 4°C, dehydrated in alcohol, paraffin-embedded with Tissue-Tek VIP 6 AI (Vacuum Infiltration Processor, Sakura Finetek), and then cut into 5-µm sections and stained with hematoxylin and eosin (H&E). For anti-GFP staining, tissue sections were dewaxed then rehydrated and boiled in HIER citrate buffer pH 6 (Zytomed, Diagnostica) in an autoclave (Retriever 21000, Proteogenix) for unmasked and stained with anti-GFP antibody (1:200, clone JL-8, #632381, Clontech (R)) following manufacturer's instructions ("Mouse-on-Mouse" detection kit, MOM, BMK-2202, Vector Laboratories). Images were acquired on Olympus BX51 Microscope Light-path (Olympus).

Transcriptome and qRT-PCR Analysis

10⁵ Donor JAK2^{V617F} LSK-sorted cells were transplanted into the irradiated leg of recipient mice. After developing PV disease symptoms, JAK2^{V617F} HSPCs (ST-HSC and LT-HSCs) cells from irradiated and nonirradiated leg BM were sorted and lysed with RLT Plus Buffer (QIAGEN). Total RNA was extracted according to the protocol of RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN). The RNA integrity (RNA Integrity Score ≥7.0) was checked on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) and quantity was determined using Qubit (Invitrogen). For transcriptome analysis, total RNA samples were prepared with the GeneChip Whole-Transcript (WT) Pico Reagent Kit and analyzed with the GeneChip Whole-Transcript Expression array using Clariom S assay following manufacturer's instructions (Thermo Fisher). Data were collected and analyzed with the TAC software recommended by the manufacturer (Thermo Fisher). For quantitative RT-PCR analysis, total RNA was extracted according to the protocol of RNeasy Plus Micro Kit (QIAGEN) and cDNAs were synthesized by the reverse transcription using SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen). qRT-PCR was performed by using StepOnePlus Real-Time PCR System with TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems). Primers used for detection of target *CA1* gene (Car1-Mm00486717_m1) were purchased from Applied Biosystems. The gene expression level was calculated on the basis of the 2^{-ΔΔC_t} method.

Car1 Genetic Inhibition

To perform *CAR1* inhibition experiments, shRNA sequences directed against Mm*Car1* gene (see these sequences below) were cloned in pTRIP-MND-Cherry-H1 plasmid (from CEA/iRCM/CIGEx). Briefly, shRNA sequences were generated by annealing a complementary pair of primers harboring homology sequence to pTRIP-MND-Cherry-H1 plasmid digested by *Bam*HI for further cloning by complementary single-strand annealing-based method (32). Sh CTL sequence was directed against hepatitis C virus (HCV, GTGTTGGGTCGCGAAAGG). All enzymes were from New England Biolabs, antibiotics from

Sigma-Aldrich, and primers from Eurofins Genomics (Supplementary Table S1). All constructs were validated by DNA sequencing. 10^5 Donor WT or JAK2^{V617F} LSK-sorted cells were transduced with the 3 *Car1* shRNAs or Ctl shRNA in BIT 9500 serum with mSCF (100 ng/mL), mFLT3 (100 ng/mL), mIL3 (20 ng/mL), IL6 (10 ng/mL), and TPO (10 nmol/L) at 37°C for 24 hours and transplanted into the irradiated leg of recipient mice. More than 85% of the transduced LSK cells were detected positive for fluorescence expression of mCherry before grafting.

To perform rescue experiments, a mutant silent *Car1* cDNA containing silent mutations that impair the effect of the 3 shRNAs was synthesized (bold letters indicate the mutated sequences)

sh1:

Sequence targeted by sh1: AGAACAGTCAGAGCCTCATTT
Mutated sequence: CGAACTGTCGGTCTAGCTTC
Protein sequence: R T V R A S F

These mutations create a *NheI* site.

sh2:

Sequence targeted by sh2: CTGCTTCCTCATCTCTGGATTAC
Mutated sequence: CTTCTACCGAGCTCTTTGGACTAC
Protein sequence: L L P S S L D Y

These mutations create a *SacI* site.

sh3:

Sequence targeted by sh3: ACCGTGGATGGAAGTATATTCT
Mutated sequence: ACTGTGCGACGGCACTCGATACTCT
Protein sequence: T V D G T R Y S

These mutations create a *SalI* site.

Silent mutant *Car1* cDNA was cloned in pTRIP-dU3-EF1-MND-ECFP plasmid (from CEA/iRCM/CIGEx) and sequenced. JAK2^{V617F} Lin⁺cKit⁺ cells from single-leg-irradiated mice ($n = 9$) transplanted with JAK2^{V617F} BM cells were sorted and cotransduced with a lentivirus expressing control sh (shCtl) or sh1 or sh2 or sh3 that target *Car1* mRNA and a lentivirus expressing a WT CAR1 protein (silent mutant CAR1 as SmCAR1) from silent mutant *Car1* cDNA in StemSpan medium supplemented with mSCF (100 ng/mL), mFLT3 (100 ng/mL), and IL11 (10 ng/mL) at 37°C for 24 hours. These transduced were maintained with an additional 24 hours in the same medium and cultured for 3 days in erythroid medium conditions (StemSpan with mSCF, 100 ng/mL) and EPO (1 U/mL). The different hematopoietic populations were then analyzed by FACS.

Pharmacologic Treatment

Furosemide (MKCF8657) and acetazolamide (A6011) was purchased from Sigma. Furosemide was dissolved in DMSO for stock solution (50 mg/mL) and diluted in PBS solution prior to use. At indicated time, recipient mice were daily treated by intravenous injection of furosemide at 5 or 20 mg/kg or of acetazolamide (50 mg/kg). Spironolactone (Sigma) was prepared in water bottles at 250 mg/kg to treat recipient mice as described previously (33).

Whole-Transcriptome RNA-seq of CD34⁺ Cells from Patients

The patients were selected for a high JAK2^{V617F} variant allele frequency (60–100% VAF). Blood samples from patients were obtained from Gustave Roussy (Villejuif, France), Saint Louis Hospital (Paris, France), and Saint Antoine Hospital (Paris, France). Control donor samples were obtained from donors after leukapheresis. Peripheral blood from patients was collected in EDTA tubes. Hematopoietic progenitors (CD34⁺) of 4 patients with PV and of 4 control donors were isolated from mononuclear cells (MNC) by immunomagnetic enrichment (Miltenyi Biotec) and were amplified for 5 days in

serum-free medium in the presence of a cocktail of human recombinant cytokines containing EPO (1 U/mL; Amgen), TPO (20 ng/mL; Kirin), SCF (25 ng/mL; Biovitrum AB), IL3 (10 ng/mL), FLT3-L (10 ng/mL), G-CSF (20 ng/mL), and IL6 (100 U/mL; Miltenyi Biotec). Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). The RNA integrity (RNA Integrity Score ≥ 7.0) was checked on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) and RNA quantity was determined using Qubit (Invitrogen). SureSelect Automated Strand Specific RNA Library Preparation Kit was used according to manufacturer's instructions with the Bravo Platform. Briefly, 50 to 200 ng of total RNA sample was used for poly-A mRNA selection using oligo(dT) beads and subjected to thermal mRNA fragmentation. The fragmented mRNA samples were subjected to cDNA synthesis and were further converted into double-stranded DNA using the reagents supplied in the kit, and the resulting dsDNA was used for library preparation. The final libraries were bar-coded, purified, pooled together in equal concentrations, and subjected to paired-end sequencing on the Novaseq-6000 sequencer (Illumina) at Gustave Roussy.

mRNA Expression Analysis of CD34⁺ Cells from Patients

Total RNA of CD34⁺ cells from 4 to 9 patients was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) and cDNA was synthesized by SuperScript IV Reverse Transcriptase (Invitrogen). PCR were carried out in the ABI Prism GeneAmp 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Invitrogen), using TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) and with specific primers (CA1-Hs00266139_m1, Thermo Fisher Scientific). *HPRT* was used as housekeeping gene.

Automated Capillary Immunoassay (WES)

Automated capillary immunoassay (Simple Western) was performed on a Western immunoassay (WES) system (Protein Simple). Mouse HSPC or Lin⁺ cells and human CD34⁺ cells were incubated with a RIPA buffer for 30 minutes, centrifuged for 15 minutes at 14,000 $\times g$, and protein supernatants were stored at -80°C . The protein equivalent of 5,000 cells was used to carry out WES experiments. Car1 (NBP1, BIOTECHNE) and GAPDH (Cell Signaling Technology) antibodies were, respectively, used at a 1:50 and 1:100 dilution for both mouse and human proteins. The analyses were performed on a 12–230 kDa separation module (SM-W004) according to the manufacturer's instructions (Protein Simple).

Statistical Analyses

Experiments were performed on 8 to 12 recipient mice except when indicated and on 4 to 9 patients with PV. Data are provided as mean \pm SEM. All data were tested for significance using unpaired two-tailed *t* test and two-way ANOVA, following by *post hoc* analysis. Survival rate was investigated by Kaplan–Meier plot and tested with log-rank test statistics. In all tests, *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; ****, *P* < 0.0001).

Data Availability

All data (Figs. 1–4; Supplementary Figs. S1–S5) are available in the Article or from the corresponding authors on reasonable request. Raw data transcriptome files are available on GEO repository with the accession number GSE165902 and raw data RNA-seq files are available on EGA repository with the accession number EGAD00001007531.

Authors' Disclosures

S. Murakami reports a patent for EP21165307 pending. V. Barroca reports a patent for EP21165307 pending. P. Romeo reports a

patent for EP21165307 pending. D. Lewandowski reports a patent for EP21165307 pending. No disclosures were reported by the other authors.

Authors' Contributions

S. Murakami: Resources, software, formal analysis, funding acquisition, validation, investigation. **V. Barroca:** Resources, data curation, validation. **L. Perie:** Data curation, formal analysis. **A. Bravard:** Formal analysis. **J. Bernardino-Sgherri:** Formal analysis. **A. Tisserand:** Resources, data curation, formal analysis. **C. Devanand:** Resources, data curation. **V. Edmond:** Resources, data curation. **A. Magniez:** Resources, data curation. **S. Tenreira Bento:** Resources, data curation. **C. Torres:** Resources, data curation. **F. Pasquier:** Resources. **I. Plo:** Resources. **W. Vainchenker:** Resources. **J. Villeval:** Resources, funding acquisition. **P. Romeo:** Conceptualization, supervision, funding acquisition, writing—original draft, writing—review and editing. **D. Lewandowski:** Conceptualization, resources, data curation, software, formal analysis, supervision, funding acquisition, validation, investigation, visualization, methodology, writing—original draft, project administration, writing—review and editing.

Acknowledgments

We thank members of the iRCM animal facility; the Curie NGS core facility for transcriptome and barcode experiments; the Gustave Roussy genomic core facility for human RNA-seq; D. Busso and G. Piton from CEA/iRCM/CiGEx core facility for design and production of shRNA and silent mutant CAR1 lentiviruses; V. Menard from the irradiation platform for technical assistance on local irradiation; the iRCM flow cytometry core facility; F. Ferri for assistance on transcriptome analysis, M.L. Arcangeli for technical assistance on CFU assays, C. Carles and D. Gay for critical reading of the manuscript and writing assistance. We thank the grant "Taxe d'apprentissage" Gustave Roussy-2019 and the bioinformatic platform (M. Deloger and T. Dayris). This work was supported by grants of the Radiobiology Program of the French Alternative Energies and Atomic Energy (CEA), Inserm, ARC, Fondation de France and INCA-Emergent.

Received March 2, 2021; revised July 21, 2021; accepted March 10, 2022; published first March 15, 2022.

REFERENCES

- Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood* 2010;115:3589–97.
- Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S, et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J Exp Med* 2014;211:2213–30.
- James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signaling causes polycythemia vera. *Nature* 2005;434:1144–8.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–61.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005;7:387–97.
- Wernig G, Kharas MG, Okabe R, Moore SA, Leeman DS, Cullen DE, et al. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. *Cancer Cell* 2008;13:311–20.
- Kiladjian J-J, Giraudier S, Cassinat B. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. *Leukemia* 2016;30:776–81.
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 2013;369:2391–405.
- Tefferi A, Pardanani A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc* 2011;86:1188–91.
- Helbling PM, Piñero-Yáñez E, Gerosa R, Boettcher S, Al-Shahrour F, Manz MG, et al. Global transcriptomic profiling of the bone marrow stromal microenvironment during postnatal development, aging, and inflammation. *Cell Rep* 2019;29:3313–30.
- Shirvaikar N, Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A. Hematopoietic stem cell mobilization and homing after transplantation: the role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. *Biochem Res Int* 2012;2012:11.
- Perié L, Duffy KR, Kok L, De Boer RJ, Schumacher TN. The branching point in erythro-myeloid differentiation. *Cell* 2015;163:1655–62.
- Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2018;93:1551–60.
- Santos FPS, Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, Thomas D, Pollock R, et al. Splenectomy in patients with myeloproliferative neoplasms: efficacy, complications and impact on survival and transformation. *Leuk Lymphoma* 2014;55:121–7.
- Bowman RL, Busque L, Levine RL. Clonal hematopoiesis and evolution to hematopoietic malignancies. *Cell Stem Cell* 2018;22:157–70.
- Supuran CT. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *J Enzyme Inhib Med Chem* 2016;31:345–60.
- Supuran CT. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:168–81.
- Pérez-Ayuso RM, Arroyo V, Planas R, Gaya J, Bory F, Rimola A, et al. Randomized comparative study of efficacy of furosemide versus spironolactone in nonazotemic cirrhosis with ascites. Relationship between the diuretic response and the activity of the renin-aldosterone system. *Gastroenterology* 1983;84:961–8.
- Glaite-Santar C, Desmond R, Feng X, Bat T, Chen J, Heuston E, et al. Functional niche competition between normal hematopoietic stem and progenitor cells and myeloid leukemia cells. *Stem Cells* 2015;33:3635–42.
- Stiehl T, Wang W, Lutz C, Marciniak-Czochra A. Mathematical modeling provides evidence for niche competition in human AML and serves as a tool to improve risk stratification. *Cancer Res* 2020;80:3983–92.
- Perner F, Perner C, Ernst T, Heidel FH. Roles of JAK2 in aging, inflammation, hematopoiesis and malignant transformation. *Cells* 2019;8:854.
- Habbel J, Arnold L, Chen Y, Ollmann MM, Bruderek K, Brandau S, et al. Inflammation-driven activation of JAK/STAT signaling reversibly accelerates acute myeloid leukemia in vitro. *Blood Adv* 2020;4:3000–10.
- Hasan S, Lacout C, Marty C, Cuingnet M, Solary E, Vainchenker W, et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood* 2013;122:1464–77.
- Challen GA, Goodell MA. Clonal hematopoiesis: mechanisms driving dominance of stem cell clones. *Blood* 2020;136:1590–8.
- Mo JR, Mathur A, Angagaw M, Zhao S, Wang Y, Gargano D, et al. Splenectomy normalizes hematocrit in murine polycythemia vera. *PLoS One* 2009;4:e2786.
- 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;372:426–35.
- Villeval JL, Testa U, Vinci G, Tonthat H, Bettaieb A, Titeux M, et al. Carbonic anhydrase I is an early specific marker of normal human erythroid differentiation. *Blood* 1985;66:1162–70.
- Dai HY, Hong CC, Liang SC, Yan MD, Lai GM, Cheng AL, et al. Carbonic anhydrase III promotes transformation and invasion capability in hepatoma cells through FAK signaling pathway. *Mol Carcinog* 2008;47:956–63.

29. Zhang J, Tsoi H, Li X, Wang H, Gao J, Wang K, et al. Carbonic anhydrase IV inhibits colon cancer development by inhibiting the Wnt signalling pathway through targeting the WTAP-WT1-TBL1 axis. *Gut* 2016;65:1482–93.
30. Yasin JK, Chaudhary S, Verma N, Vennila S. Carbonic anhydrase network of genes trigger cytosolic pH enabling differentiation from quiescence. *bioRxiv* 2018.
31. Croker BA, Metcalf D, Robb L, Wei W, Mifsud S, DiRago L, et al. SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. *Immunity* 2004;20:153–65.
32. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods* 2007;4:251–6.
33. Rafael-Fortney JA, Chimanji NS, Schill KE, Martin CD, Murray JD, Ganguly R, et al. Early treatment with lisinopril and spironolactone preserves cardiac and skeletal muscle in duchenne muscular dystrophy mice. *Circulation* 2011;124:582–8.



Inferring the initiation and development of myeloproliferative neoplasms

Gurvan Hermange^a, Alicia Rakotonirainy^a, Mahmoud Bentriou^a , Amandine Tisserand^{b,c,d} , Mira El-Khouy^{b,c,d} , François Girodon^{e,f} , Christophe Marzac^{b,c,g,h}, William Vainchenker^{b,c,g}, Isabelle Plo^{b,c,g,1} , and Paul-Henry Cournède^{a,1}

Edited by Simon Tavare, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; received November 15, 2021; accepted August 4, 2022

The developmental history of blood cancer begins with mutation acquisition and the resulting malignant clone expansion. The two most prevalent driver mutations found in myeloproliferative neoplasms—*JAK2*^{V617F} and *CALR*^m—occur in hematopoietic stem cells, which are highly complex to observe in vivo. To circumvent this difficulty, we propose a method relying on mathematical modeling and statistical inference to determine disease initiation and dynamics. Our findings suggest that *CALR*^m mutations tend to occur later in life than *JAK2*^{V617F}. Our results confirm the higher proliferative advantage of the *CALR*^m malignant clone compared to *JAK2*^{V617F}. Furthermore, we illustrate how mathematical modeling and Bayesian inference can be used for setting up early screening strategies.

mathematical modeling of cell populations | myeloproliferative neoplasms | *JAK2*/*CALR* mutations | cancer early detection | approximate bayesian computation

Myeloproliferative neoplasm (MPN) blood cancers are characterized by abnormal proliferation of myeloid hematological cells. These pathologies result from gain-of-function somatic mutations of specific genes occurring in hematopoietic stem cells (HSCs). Two main driver mutations of the MPN disease affect genes encoding proteins playing a crucial role in cell signaling: *JAK2* (*JAK2*^{V617F}) and calreticulin (exon 9 mutations, *CALR*^m) (1–6). However, their precise role in the development of clonal hematopoiesis and in the disease dynamics remains poorly understood. Of particular debate is the expansion kinetics of a malignant clone emanating from a single mutated cell. While *JAK2*^{V617F} was reported to be acquired decades before disease onset and even during fetal life (7–10), there is no such result for the *CALR*^m mutation. MPNs are generally detected at advanced ages when the malignant clone is present at significant Variant allele frequency (VAF) in peripheral blood. Late detection, often after complications such as thrombosis and cardiovascular events, or more rarely at the leukemic stage, further increases the death rate. Methods to understand disease initiation and clonal expansion of mutated HSCs are thus crucial to develop adequate screening strategies and to avoid delayed medical care.

A major difficulty for this task comes from the fact that human HSCs are difficult to access and in vivo expansion of mutated HSCs cannot be observed. We therefore propose a mathematical model to infer the dynamics of the disease, from the acquisition of the driver mutation to the appearance of the symptoms. Stochastic models, such as the Wright-Fisher model used in population genetics (11) or branching processes (12), are appropriate choices to describe the expansion of a clone from a unique mutated cell. However, their calibration from real observations remains challenging and requires setting up an extensive optimization procedure to achieve convergence of the algorithms in a realistic time.

To understand how *JAK2*^{V617F} and *CALR*^m malignant clones might expand over time, we propose a model relying on a continuous-time Markov chain (CTMC) process. When a certain number of mutated HSCs is reached, we show numerically that a deterministic law can approximate the process. This approximation further facilitates the calibration of the model that otherwise would not be computationally feasible. We estimate the model parameters using an approximate Bayesian computation method based on sequential Monte Carlo (ABC-SMC) (13, 14), with data from recently diagnosed *JAK2*^{V617F} and *CALR*^m patients. To achieve a faster convergence, we use an optimal affectation procedure based on the Hungarian algorithm (15, 16). We apply this mathematical approach—combining modeling and statistical inference—to investigate potential differences in the disease dynamics of *CALR*^m vs. *JAK2*^{V617F} MPN patients.

Results

***CALR*^m Mutations Appear to be Acquired Later than *JAK2*^{V617F}.** To analyze the initiation and dynamics in MPN disease and compare the expansion kinetics of *CALR*^m

Significance

Myeloproliferative neoplasm (MPN) blood cancers are often detected at an advanced age, after complications such as thrombosis and cardiovascular events. Understanding the MPN disease dynamics (initiation and development) could help set up early screening strategies, and more broadly, provide insight into the developmental history of blood cancer. For that purpose, we developed a mathematical approach combining modeling and statistical inference and apply it to the two most prevalent mutations in MPNs. We evidence differences in the clonal expansion of the *CALR*^m mutation compared to *JAK2*^{V617F}, suggesting different types of mechanisms for the driver mutation acquisition.

Author affiliations: ^aLaboratory of Mathematics and Informatics (MICS), Université Paris-Saclay, CentraleSupélec, Gif-sur-Yvette, 91190 France; ^bINSERM U1287 (INSERM, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay), Villejuif, 94800 France; ^cGustave Roussy, Villejuif, 94800 France; ^dUniversité Paris-Cité, Paris, 75013 France; ^eLaboratoire d'Hématologie, CHU Dijon, Dijon, 21000 France; ^fINSERM, UMR866, Centre de Recherche, Dijon, 21000 France; ^gUniversité Paris-Saclay, Villejuif, 94800 France; and ^hLaboratoire d'Immuno-Hématologie, Gustave Roussy, Villejuif, 94800 France

Author contributions: I.P. and P.-H.C. led and designed research; G.H., A.R., M.B., A.T., M.E.K., F.G., C.M., W.V., I.P., and P.-H.C. performed research and reviewed the paper; G.H., I.P., and P.-H.C. analyzed data; and G.H., I.P., and P.-H.C. wrote the paper.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2022 the Author(s). Published by PNAS. This article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: isabelle.plo@gustaveroussy.fr or paul-henry.cournede@centralesupelec.fr.

This article contains supporting information online at <http://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2120374119/-/DCSupplemental>.

Published September 9, 2022.

vs. $JAK2^{V617F}$ malignant clones, we propose an approach based on mathematical modeling (Fig. 1A) focusing on the proliferation dynamics of mutated HSCs (see *Materials and Methods*). In brief, we assume that a given mutated HSC divides at a rate α into 0, 1, or 2 mutated HSCs, depending on whether the division is differentiated, asymmetric, or symmetric, with probabilities p_0 , p_1 , and p_2 , respectively (Fig. 1B). Daughter cells, if not HSCs, are progenitor cells that will further proliferate to give rise to mature cells (Fig. 1C). We denote by $N(t)$ the number of mutated HSCs that have expanded from a single mutated cell at age $t > T_0$, with T_0 satisfying $N(T_0) = 1$ (Fig. 1D). We further assume that the acquisition time T_0 follows an exponential distribution

of mean $\lambda > 0$ (Fig. 1D, iii). $T_0 > 0$ corresponds to an occurrence of the mutation after birth. Since Williams et al. (8) reported that $JAK2^{V617F}$ might be acquired in fetal life, we also verify if our data could be in agreement with the hypothesis of mutation acquisition in utero ($T_0 = 0$) for all individuals, corresponding to the limit case $\lambda = 0$ (Fig. 1D, ii).

Parameter values are estimated from single observations of 26 patients diagnosed with $JAK2^{V617F}$ or $CALR^m$ MPNs using a likelihood-free estimation procedure, namely ABC-SMC (17). Data (D), previously reported by Mosca et al. (18) and El-Khoury et al. (19), consist of clonal fractions (CF) for progenitor cells (see *Materials and Methods* and Fig. 2A). We

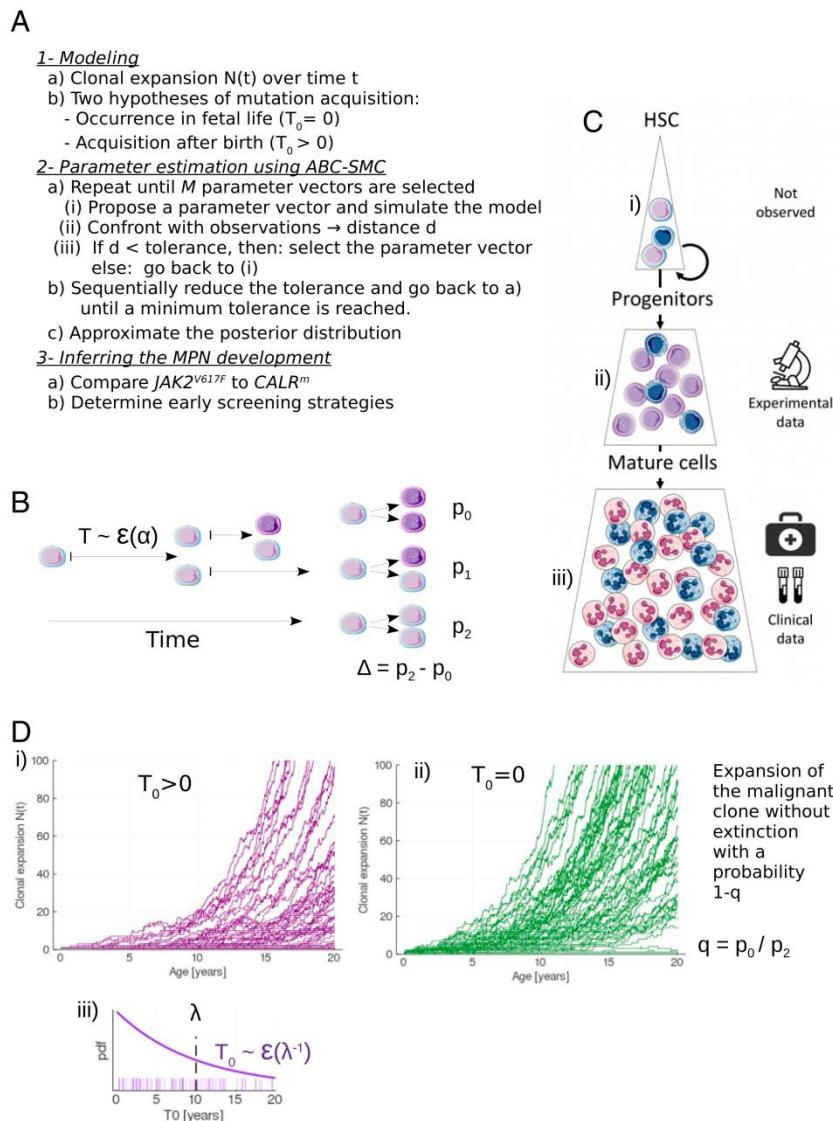


Fig. 1. Method and model for inferring the development of MPNs. (A) Overview of the method. (B) Modeling the stem cell proliferation dynamics: a given mutated HSC divides after a random time T that follows an exponential law $\mathcal{E}(\alpha)$ of rate α . After dividing, the mutated HSC gives birth to 0, 1, or 2 mutated HSC with probabilities p_0 , p_1 , or p_2 , respectively. Daughter cells, if not HSCs, are progenitor cells (represented in a darker color). On this example, the first division is symmetric, and the division of one of the daughter cells (on the top) is asymmetric. (C) The hematopoietic dynamics can be modeled with three compartments: i) the stem cell pool consisting of a limited number of HSCs that can self-renew and thus drive the long-term clonal expansion; ii) the progenitor cells ($CD34^+$) that arise from HSCs. Our model of MPN expansion is calibrated from measured CF of those cells; iii) a pool of mature cells, whose measure of the VAF in clinical routine can allow the early detection of the mutation. Blue cells are mutated. (D) Modeling the stochastic expansion of the malignant clone from a single mutated cell, where $N(t)$ is the number of mutated HSCs over time t . Two hypotheses are compared for the modeling of the mutation acquisition: either i) after birth ($T_0 > 0$) or ii) during fetal life ($T_0 = 0$). In the former case, T_0 follows an exponential law $\mathcal{E}(1/\lambda)$, of rate $1/\lambda$ (where $\lambda > 0$ corresponds to the mean acquisition time), whose probability density function (pdf) is represented in (iii). For each scenario 100 simulations are computed, with $\alpha = 1/30$, $\Delta = 0.02$, $q = 1/3$, and $\lambda = 10$ (for (i) only).

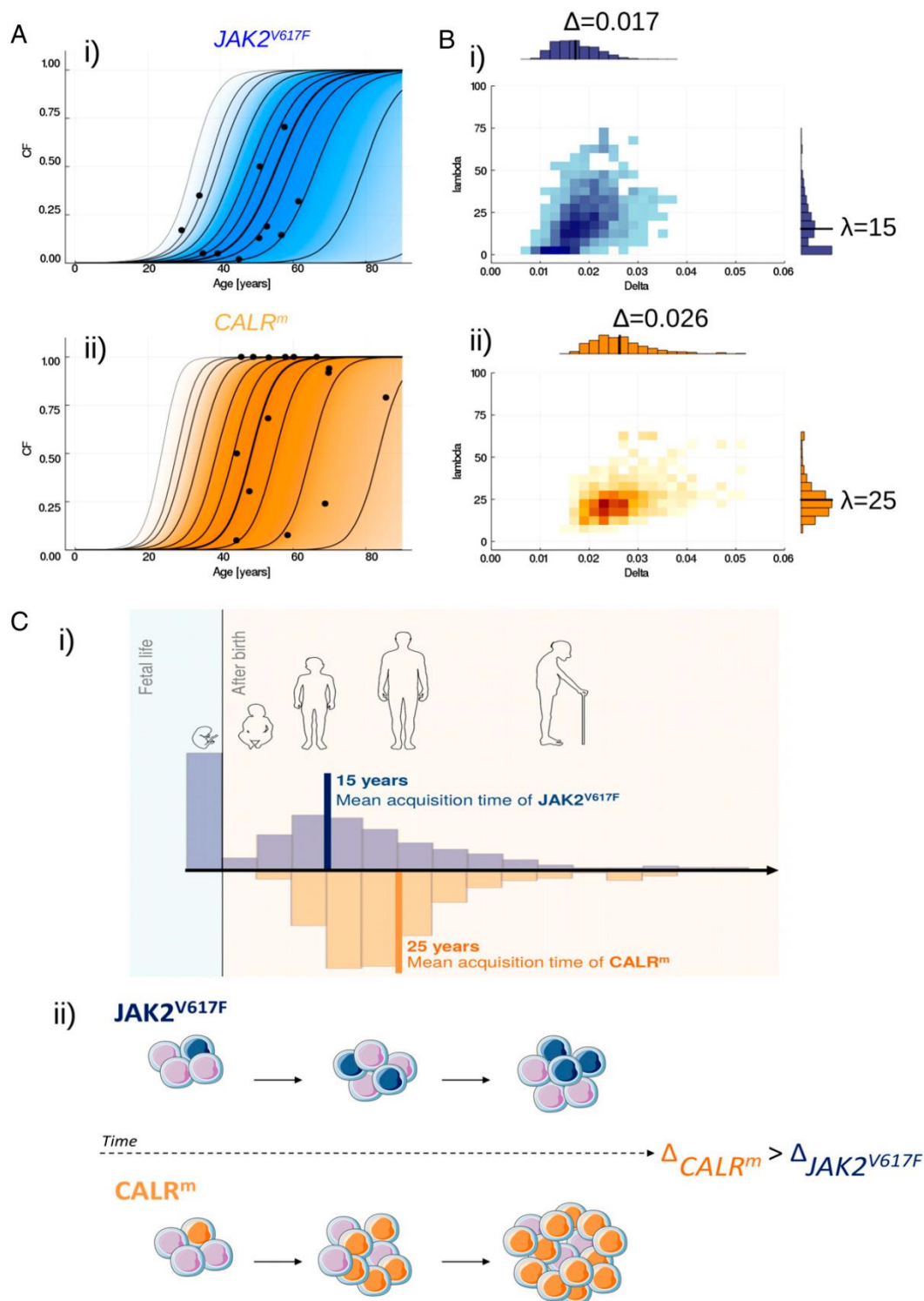


Fig. 2. Inferring the MPN development. (A) Confronting *JAK2^{V617F}* (i) or *CALR^m* (ii) patient observations (black points) to the inferred evolution of the CF among progenitor cells. The dynamics of clonal expansion over time are obtained from 10,000 simulations of the model, sampling the parameters from the estimated posterior distributions. The bold line represents the median CF, computed over 10,000 simulated trajectories at each age, when the lines on both sides materialize 25, 50, 75, 90, 95 and 99% credibility intervals. The gradient of color indicates where the trajectories can be found; the darker, the higher probability. (B) Estimated joint posterior distributions of parameters Δ and λ , for *JAK2^{V617F}* (i) or *CALR^m* (ii). Black solid lines in the one-dimensional histograms correspond to the mean values. The darkest regions on the two-dimensional histograms correspond to those of higher probability density. (C) Schematic representation of the MPN development for *JAK2^{V617F}* and *CALR^m* malignant clones. i) *JAK2^{V617F}* mutation is found to be acquired earlier on average than *CALR^m* mutation (15 vs. 25 y old), and potentially during fetal life (with probability $p[\lambda = 0 | D] = 0.24$ when the same probability is estimated at zero for *CALR^m*). The histograms represent the distribution of parameter λ . ii) *CALR^m* is found to have a higher proliferative advantage at the stem cell level than *JAK2^{V617F}*. *CALR^m* malignant clone (in orange) will expand over time in a pool of WT HSCs (purple cells) at a higher rate than *JAK2^{V617F}* (in blue).

estimate the model parameters separately for $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ patient populations. The mean mutation acquisition time of the $JAK2^{V617F}$ mutation $E[\lambda]$ is estimated at ~ 15 y (Fig. 2 B, *i*). Furthermore, concerning the hypothesis that mutation occurs in fetal life for the population of $JAK2^{V617F}$ patients, we estimate its probability $p[\lambda = 0 | D]$ to be equal to 0.24. These findings are consistent with the values reported by Van Egeren et al. (7) and Williams et al. (8) (*SI Appendix, section E.1*). Interestingly, for the $CALR^m$ patient population, we infer that almost surely $\lambda > 0$, that is, the hypothesis of a mutation acquisition during fetal life for all $CALR^m$ patients is unlikely. We also estimate a higher expected mean acquisition time ($E[\lambda] \sim 25$ y) than for $JAK2^{V617F}$ (Fig. 2 B, *ii* and C, *i*).

Higher Proliferative Advantage Inferred for the $CALR^m$ Malignant Clone. In the proposed model, the proliferative advantage of the mutated cells is described thanks to parameter $\Delta = p_2 - p_0$, which represents the unbalance between symmetric and differentiated divisions that drives the clonal expansion of the mutation when $\Delta > 0$. The higher its value, the faster the malignant clone will expand. We estimate Δ for $CALR^m$ and $JAK2^{V617F}$ malignant clones separately and infer that the proliferative advantage of the $CALR^m$ malignant clone at the stem cell level is higher than that of $JAK2^{V617F}$ (Fig. 2B), with mean values of Δ respectively equal to 0.026 and 0.017. The propensity of $CALR^m$ HSCs for symmetric divisions and thus for the invasion of the stem cell pool is higher than that of $JAK2^{V617F}$ HSCs (Fig. 2 C, *ii*). This observation explains that, even if the $CALR^m$ mutation is acquired later in life, the malignant clone can generally reach high CF more quickly (Fig. 2A). Our estimate of Δ for $JAK2^{V617F}$ is bigger than the one found by Watson et al. (9), since we estimate Δ from observations of individuals having an MPN while Watson et al. (9) studied clonal hematopoiesis of healthy donors (*SI Appendix, section E.2*). In addition, we estimate a high probability of stochastic extinction ($q = p_0/p_2$) for $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ malignant clones, with mean values of $q = 0.94$ and 0.87 , respectively, meaning that the acquisition of the mutation would lead to a clonal expansion—and then potentially a disease onset—in only $\sim 10\%$ of the cases (*SI Appendix, section D.2*).

Early Screening Might be a Viable Clinical Option to Detect $JAK2^{V617F}$ Mutations. Having estimated the mean parameter values of the model and their probability distributions, we can infer the MPN development and deduce early screening strategies (see *Materials and Methods* and Fig. 3A). The goal is to detect the mutation of interest in an individual as early as possible, i.e., before the onset of the disease. Early screening requires collecting blood samples from individuals and performing analysis of the gene of interest to measure the VAF in the peripheral blood (note that we always associate the term VAF with mature cells). The usual techniques in clinical practice can detect $CALR^m$ mutations at a VAF above 2% with CALR sizing and at around 0.1% for $JAK2^{V617F}$ (0.01 to 1% using allele-specific PCR). We consider that the detection is too late if the CF in HSCs is above 50% for $CALR^m$ (19) and above 15% for $JAK2^{V617F}$ (20), corresponding to the thresholds above which there is a high risk of MPN development and potential thrombosis. Our approach leverages the posterior distribution of the model's parameters to compute the probability of detecting the mutation at different ages and thus it can help determine the best timing for screening. The optimal age for screening is found at 30 for the $JAK2^{V617F}$ mutation (Fig. 3 B, *i*), and at 35 for the $CALR^m$ mutation (Fig. 3 B, *ii*).

At this optimal age of detection, there are three possibilities for individuals having the mutation: the detection is too late because they already suffered from symptoms of the disease, we manage to detect the mutation early (true positive), or we do not (false negative). For $CALR^m$ patients, the probability of early detection computed at the optimal screening age remains low (42%), leaving 46% of the individuals who would later develop the disease undetected, and 12% for whom the detection would be too late. In contrast, early screening might be a viable clinical option to detect $JAK2^{V617F}$ mutations, with 79% of the individuals being detected early at the optimal screening age of 30.

In addition, we study how the sensitivity of the screening techniques influences the previous results. We compare different sensitivities with detection thresholds (corresponding to the VAF in mature cells) ranging from 0.01 to 2% (Fig. 3C). Both for $CALR^m$ and $JAK2^{V617F}$ malignant clones, higher sensitivities increase the probability of detecting the mutation at lower ages. However, still at ultra-sensitive levels (detection threshold as low as 0.01%), the probability of early detection at the optimal screening age is below 65% for $CALR^m$, which is lower than the value obtained for $JAK2^{V617F}$ with a VAF threshold of 0.5% (Fig. 3 C, *iii*).

Discussion

We developed a mathematical approach combining modeling and statistical inference to help infer the disease dynamics (initiation and development) and set up early screening strategies in MPNs, specifically $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ MPNs. Both driver mutations occur in HSCs, making it difficult to study this disease experimentally in humans and justifies the use of mathematical models. These are necessarily simplifications of reality and are based on several assumptions, without which it would not be possible to make statistical inferences from data. We assumed that model parameters only depend on the type of the main driver mutation ($JAK2^{V617F}$ vs. $CALR^m$) and not on the patients. Thus, heterogeneity between patients was only considered to result from stochastic effects. To refine our results and explore the influence of additional genetic factors, we would need to increase the number of patients included in our cohort to split them into subgroups of sufficient size. In particular, it would be relevant to increase the number of $CALR^m$ patients to account for differences between $CALR^m$ T1 and T2 mutations, which are clinically distinct (21). A limitation of our work is that we only include patients without homozygous subclones. Yet, homozygous mutated cells are supposed to have an increased proliferative advantage that might accelerate the disease development (8). Thus, an extension of our work would be to complexify the model by integrating the homozygous subclones dynamics. Such an extended model could also describe the expansion of subclones with additional MPN mutations (*TET2*, *DNMT3A*, etc.). The proliferative advantage of malignant clones, modeled by Δ , was also considered constant over life. However, more accurate models should probably take into account threshold effects, possibly justified by regulatory mechanisms, to avoid the possibility of unrealistic high clonal expansion. Wild-type (WT) HSCs are also likely to acquire mutations that increase their proliferative advantage, reducing the relative selective advantage of $JAK2^{V617F}$ or $CALR^m$ clones, while these latter could also acquire associated mutations, increasing their proliferative advantage. Parameter Δ should be thus considered an averaged value that embeds different effects occurring over life. Besides, we implicitly considered that the

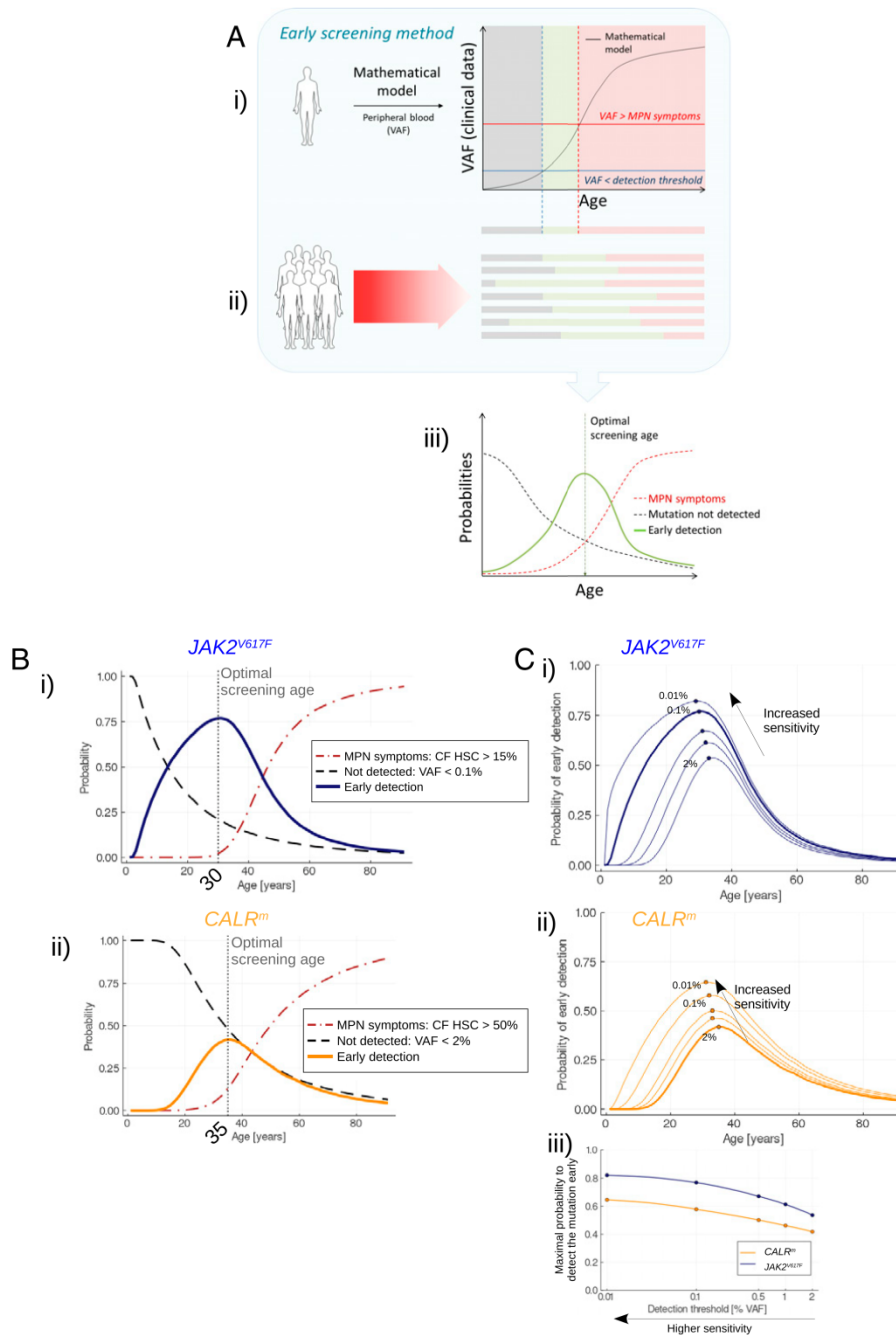


Fig. 3. Early screening. (A) Overview of the method for determining the optimal screening age. *i)* One trajectory of the stochastic model (after its calibration from actual observations) corresponds to the disease expansion in an arbitrary (randomly sampled) patient. From the model, we obtain the progression of the VAF in mature cells over the years. Three periods in the patient's life can be considered. First, the VAF is lower than a detection threshold (gray area); the malignant clone has already begun expanding but is still undetectable. Then (green area), the mutation becomes detectable still with a sufficiently low CF so that there is a low risk of MPN symptoms. Theoretically, it would be the appropriate period for the early screening of this particular patient. Eventually, the malignant clone continues to expand; the VAF exceeds a threshold above which there is a risk of MPN symptoms (red area); screening would be too late. *ii)* Because of the heterogeneity between patients, the three previously defined periods [mutation not detected (gray); early detection (green); and MPN symptoms (red)] are different between individuals. *iii)* Considering a high number of MPN patients, we obtain as functions of age the frequencies (or probabilities) of early screening (green line), to not detect the mutation (dashed gray line), or to have MPN symptoms (red dashed line). The probability of early screening reaches a maximum at the optimal screening age, that is, the age at which it would be optimal to test the population for the considered mutation. The value reached at the optimal screening age corresponds to the highest proportion of patients that would be detected early enough (according to our mathematical model and its calibration). The higher this value, the more efficient the screening. (B) Evolution of the probability of early detection (solid line, blue for JAK2^{V617F} (i) and orange for CALR^m (ii)), false negative rate (dashed line), and too late detection (dash-dotted line) when testing the population for the JAK2^{V617F} (i) or CALR^m (ii) mutation at different ages. Here, we consider that CALR^m mutation is detected in mature cells for a VAF higher than 2% (sizing CALR) and that JAK2^{V617F} is detected for a VAF higher than 0.1% (allele-specific PCR). (C) Impact of the sensitivity of the techniques for detecting JAK2^{V617F} (i) or CALR^m (ii) mutations. As expected, higher sensitivities increase the probability to detect the mutations, at earlier ages. In (iii), we compute the maximal probability to detect the mutation (at the corresponding optimal screening age) for different VAF thresholds ranging from 2 to 0.01% (x-axis in log scale).

evolution of MPN blood cancers is driven by natural selection by assuming $\Delta > 0$ and proliferation of the malignant clone occurring in a large and constant pool of WT HSCs. As discussed in Lyne et al. (22), a proper estimation of the number of WT HSCs would be essential to distinguish natural selection from neutral evolution, but also in our case, to quantify more precisely parameter Δ . Furthermore, the fact that aged HSCs might encounter more symmetric divisions, as discussed in Florian et al. (23), would imply that the number of WT HSCs increases over age and does not stay constant. More complex models could be developed, but they would require longitudinal observations and larger datasets for their calibration. Our model has the advantage that it can be used to study other mutations occurring in various blood cancers and that its calibration only needs measures of CF among progenitor cells. Applied to the $JAK2^{V617F}$ mutation, we found a mean acquisition time consistent with other studies (7, 8). Our estimate of parameter Δ is bigger than that obtained by Watson et al., who studied clonal hematopoiesis of normal individuals (9); the aggressiveness of MPNs appears compatible with a higher proliferative advantage of the mutant clones compared to general clonal hematopoiesis (24–26). Furthermore, by applying the same approach to $CALR^m$ patients, we could evidence differences between the clonal expansion of the two main driver mutations in MPNs. These different effects of $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ have also been observed in mouse models through competitive engraftment of bone marrow cells at limiting dilution of HSCs in which the $CALR^m$ HSCs outcompete WT cells more rapidly than $JAK2^{V617F}$ HSCs to induce the disease (27–29). In agreement with our data, it has been shown in early progenitors from essential thrombocythemia patients that $JAK2^{V617F}$ gave a lower clonal dominance than $CALR^m$ (7, 19, 20, 30). Moreover, our results suggest that the $CALR^m$ mutation is unlikely acquired during fetal life, but on average 25 y after birth, in contrast to the $JAK2^{V617F}$ mutation. It is consistent with observations that young MPN patients with inaugural Budd-Chiari syndrome (mean age of 35 y) harbor more $JAK2^{V617F}$ than $CALR^m$ (90% versus 2%) (31). Yet, recent findings have also evidenced a possible acquisition of $CALR^m$ mutation in utero (32). Different types of mechanisms seem to exist for the driver mutation acquisition. A possible explanation is that a difference in the type of mutation, i.e., a point mutation for $JAK2^{V617F}$ and deletions/insertions with +1 frameshift for $CALR$ mutations, could result in two distinct types of deficient DNA repair mechanisms (leading to G->T transversion and to deletion/insertion), and that these defects might occur at different life ages. An interesting observation from Cordua et al. (33) is that even if $JAK2^{V617F}$ is more frequent than $CALR^m$ mutation in the general healthy population, the proportion of diseased patients in $CALR^m$ individuals is much higher than in $JAK2^{V617F}$ individuals. It suggests that the latency of the disease is shorter with the $CALR^m$ mutation and that the $CALR^m$ clone expands faster than $JAK2^{V617F}$ in keeping with our results. Moreover, even if the $JAK2^{V617F}$ mutation occurs before $CALR^m$, the faster expansion for $CALR^m$ can explain that the $CALR^m$ disease starts 10 y in average before the $JAK2^{V617F}$ disease (34, 35).

Finally, our inference method relies on a Bayesian framework providing the parameter probability distributions, and thus a proper assessment of parameter uncertainty. Such an approach is computationally expensive and relies on efficient numerical methods to obtain convergence of the algorithms in a realistic time. We set up an optimization procedure to make this study possible, deriving a deterministic approximation of our stochastic model, and using an optimal assignment algorithm. Then,

from the posterior distributions of the parameters, we were able to infer more precisely the dynamics of the clonal expansion and explore strategies for early screening. We found that almost half of $CALR^m$ patients would not be detected at the optimal screening age. Therefore, testing for the $CALR$ mutation is not recommended unless the individuals are examined several times in their lives. In contrast, we found that early detection might be a viable clinical option to detect $JAK2^{V617F}$ mutation, with an optimal age for measuring VAF in peripheral blood of around 30 y. Since this mutation is present in a substantial number of cases with unexplained splanchnic and cerebral thromboses for patients that exhibit a nondiagnosed MPN with low $JAK2^{V617F}$ VAF, early detection may prevent thrombotic events.

To conclude, our method, applied to the two most prevalent driver mutations for MPNs, illustrates the potential of mathematical modeling to help infer the timing of blood cancer initiation, better understand its development, and design early detection strategies tailored to the type of mutation. In the future, it may be possible to test for many malignant mutations through NGS simultaneously instead of considering each of them separately. Such a large-scale screening effort would result in a more complex optimization problem; yet, the flexibility of our modeling framework makes its extension to a panel of genes feasible. In the future, generalizing the application of our mathematical approach could yield pragmatic and efficient prevention strategies against blood cancers.

Materials and Methods

Model and Parameters. To model the MPN disease dynamics, we consider a clonal expansion in a stem cell pool whose number N_{WT} of WT cells is assumed constant and equal to 100,000 (36). The expansion from a single mutated HSC begins at age T_0 . $N(t)$ is the number of mutated cells at age t . The invasion of the stem cell pool is modeled by considering an unbalance between symmetric (occurring with probability p_2) and differentiated divisions (occurring with probability p_0). $\Delta = p_2 - p_0$, is the parameter that describes the proliferative advantage of the malignant clone, as introduced by Mosca et al. (18). Considering that the mutation confers a proliferative advantage at the stem cell level, we have $\Delta > 0$. We further assume that a given mutated HSC divides at a rate α . Mathematically, this expansion process is described as a CTMC, where the probability of extinction q of the mutant cell population is equal to $q = p_0/p_2$. Throughout all the article, we focus on trajectories without extinction. During the expansion process, mutated HSCs also give rise to progenitor cells. Although these latter arise from HSCs, their CF is not a proxy for the CF among HSCs. However, by model identification and notably estimating parameter Δ , we can infer the CF in the progenitor compartment at age t , denoted by $\eta(t)$:

$$\eta(t) = \frac{(1 - \Delta)N(t)}{(1 - \Delta)N(t) + N_{WT}} \quad [1]$$

Progenitor cells then give rise to mature cells. In clinical routine, the VAF measured in peripheral blood provides insight into the disease progression (note that we only consider heterozygous mutated cells: therefore, the percentage of mutated cells is twice that of mutated alleles). $JAK2^{V617F}$ but also, to a lesser extent, $CALR^m$ progenitor cells proliferate more than WT cells during the latest stages of hematopoiesis. Extending Eq. [1], the VAF in peripheral blood at time t is equal to:

$$\text{VAF}(t) = 0.5 \frac{(1 - \Delta)k_m N(t)}{(1 - \Delta)k_m N(t) + N_{WT}} \quad [2]$$

where k_m models the proliferative advantage of mutated cells, from progenitors to mature cells, compared to WT cells.

We consider an acquisition time T_0 that follows an exponential distribution. Without prior knowledge, the exponential law is an appropriate and convenient choice that introduces only one additional parameter to estimate, namely the mean of the exponential distribution denoted by $\lambda > 0$. $T_0 = 0$ corresponds in

our model to an acquisition in fetal life; it is not a punctual event but rather a period of about 0.75 y during which the WT stem cell pool quickly expands. Williams et al. (8) reported that $JAK2^{V617F}$ mutation could be acquired during this period. Therefore, we study two hypotheses: either the mutation occurs (for all patients of one of our two populations of interest, i.e., with $CALR^m$ or with $JAK2^{V617F}$) in fetal life, that is, $T_0 = 0$, or later after birth, $T_0 > 0$. We consider that the latter corresponds to $\lambda > 0$ when the former corresponds to the limit case $\lambda = 0$, the problem of model selection (selection between both hypotheses) is thus reduced to a question of parameter estimation. We consider a priori that $\lambda = 0$ with a nonzero probability, such that its posterior could be a zero-inflated distribution. $p[\lambda = 0 | D]$ will correspond to the probability of mutation acquisition in fetal life (SI Appendix, section B.4).

More details about the model, its assumptions, and the prior distributions of the parameters are given in SI Appendix, section A.

Data. Parameter values are estimated from the observations of 15 patients diagnosed with $CALR^m$ MPNs (19), and 11 patients diagnosed with $JAK2^{V617F}$ MPNs (18). Data were obtained by determining the clonal architecture of the CD34⁺ progenitors purified from blood samples (SI Appendix, Tables D1 and D2). Thus, we get for each MPN patient i the CF of progenitor cells $\eta(t_i)$ at time t_i that can be confronted with the theoretical value given by Eq. [1]. We only consider patients with heterozygous clones. Some patients have associated mutations with clonal hematopoiesis, so the patients of our cohort can be regarded as representative of the MPN population. Our model does not directly account for differences between patients, except for the main driver mutation ($CALR^m$ or $JAK2^{V617F}$).

More details are given in SI Appendix, section D.1.

Likelihood-Free Estimation Procedure. We consider a Bayesian framework and estimate the parameter vector's posterior distribution given the observed data D : $p(\theta|D) \propto p(D|\theta)p(\theta)$ (where θ is the parameter vector).

For CTMC, the expression of the likelihood for pointwise observations is generally intractable. We therefore use a likelihood-free estimation procedure, namely ABC-SMC (17). With this method, the posterior distribution is obtained by iterative rejection sampling, using a decreasing sequence of tolerances (SI Appendix, section B.1). In brief, the posterior distribution will be approximated based on M particles (we chose $M = 2,000$), that is, M parameter vectors. For a given particle, a parameter vector is sampled (initially from the prior distribution), the model is simulated, and generates as many dynamics as we have observations. The quadratic error (distance d) between data and simulations is computed. If d is below the considered tolerance (at the current stage of the algorithm), the parameter vector is assigned to the particle. If not, the previous steps are repeated. When each particle is associated with a parameter value, the method is repeated with a lower tolerance until the algorithm has converged, that is, until the estimation of the posterior distribution no longer changes when decreasing the tolerance (SI Appendix, Figs. B1–B3).

ABC-SMC relies on extensive model simulations and their confrontation to experimental observations in our patients' populations (first $JAK2^{V617F}$, then $CALR^m$). To achieve computation within a reasonable time (less than 6 h when running the computations in parallel using 250 processors of an HPC cluster), we optimized the procedure. First, we derived a hybrid model, considering that only the early invasion of the stem cell pool by the malignant clone is driven by stochastic effects and then switching to a deterministic expansion when we reach a sufficient number of mutated HSCs $N_c = 2,000$ (i.e., a CF approximately equal to 2%). The deterministic expansion is an approximation valid for N_c large. The choice of N_c determined through a numerical calibration procedure, is a compromise between reducing the approximation error and increasing the computation speed, that impacts the quality of the inference (SI Appendix, section B.2 and Figs. B4–B6). Second, we use an optimal assignment procedure for ABC-SMC, the Hungarian algorithm (15, 16) when comparing the simulations of all individuals to the patients' observations (SI Appendix, section B.3).

1. R. L. Levine et al., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387–397 (2005).
2. C. James et al., A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
3. E. J. Baxter et al., Cancer Genome Project, Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054–1061 (2005).

Using synthetic datasets, we check that the number of patient observations is sufficient to draw robust conclusions from the proposed parameter estimation procedure (SI Appendix, sections C.1 and C.2 and Table C1). We study how different model assumptions impact the estimation of parameter Δ (SI Appendix, section C.3). We then run these computations on the actual dataset, and evaluate the model fit quality through a leave-one-out analysis (SI Appendix, section D). Finally, we assess to what extent our results for $JAK2^{V617F}$ were consistent with other reports (SI Appendix, section E).

Optimal Strategies for Early Screening. Having estimated the parameter posterior distributions, we can infer the dynamics of the clonal expansion and thus deduce optimal strategies for early screening. We face an optimization problem. If too early, the screening will come with an essential risk of false-negative results; a high proportion of people would develop the disease but not be identified. On the other hand, if too late, people might be detected when their stem cell pool is already invaded. With the proposed model, we can then solve this optimization problem numerically since we infer the dynamics of the malignant clone initiation and expansion. We consider that the detection is too late when the CF among HSCs is above a threshold CF_{late} :

$$N(t)/(N(t) + N_{WT}) > CF_{late} \quad [3]$$

with $CF_{late} = 50\%$ for $CALR^m$ (19) and equal to 15% for $JAK2^{V617F}$ (20), corresponding to the thresholds above which there is a risk of MPN onset and potential thrombosis.

In clinical routine, only the VAF in peripheral blood is measured. However, the VAF measure is not a good proxy for the CF among progenitors, let alone stem cells. In our model, VAF(t) at time t is given by Eq. [2]. We consider that an existing mutation is not detected (false negative) when $VAF(t) < VAF_{detection}$ where $VAF_{detection} = 0.1\%$ for $JAK2^{V617F}$ and $VAF_{detection} = 2\%$ for $CALR^m$.

Finally, the optimization problem to solve is to find the age at which the probability of early screening in the population is as high as possible:

$$T^* = \max_t \mathbb{P}[VAF(t) > VAF_{detection}; N(t)/(N(t) + N_{WT}) < CF_{late} | D] \quad [4]$$

We solve this problem numerically for $JAK2^{V617F}$ and $CALR^m$ separately, evaluating the probability of early detection at age t by sampling parameters from the estimated posterior distribution. We simulate 20,000 trajectories this way and represent in Fig. 3B the probability of early screening as well as the rate of false-negative results and the probability of a too late detection (MPN symptoms), from which we can deduce the optimal age for screening.

Then, we study the effect of the sensitivity of the techniques that detect the mutation on these results (Fig. 3C).

Data, Materials, and Software Availability. Data were previously reported by Mosca et al. (18) and El-Khoury et al. (19) (SI Appendix, Tables D1 and D2).

The ABC-SMC framework used to calibrate the model was implemented using the programming language Julia and made available on GitHub: <https://gitlab-research.centralesupelec.fr/2017bentrioum/markovprocesses.jl> (37).

As well as the model implementation: <https://gitlab-research.centralesupelec.fr/2012hermange/mpn-development> (38).

All study data are included in the article and/or supporting information.

ACKNOWLEDGMENTS. P.-H.C. and I.P. received grants for the Prism Project, funded by the Agence Nationale de la Recherche under grant ANR-18-IBHU-0002, and financial support from Institut Thematique Multi-Organismes (ITMO) Cancer of Aviesan within the framework of the 2021-2030 Cancer Control Strategy, on funds administered by INSERM. This work was also supported by grants from INCA Plbio2021 and Ligue Nationale Contre le Cancer (équipe labellisée 2019) to I.P., and A.T. was a recipient from MENRT grant then from Ligue Nationale Contre le Cancer. We thank D. Madhavan and M.-L. Charpignon for their help in editing the manuscript.

4. R. Kralovics et al., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779–1790 (2005).
5. J. Nangalia et al., Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391–2405 (2013).
6. T. Klampfl et al., Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379–2390 (2013).

7. D. Van Egeren *et al.*, Reconstructing the lineage histories and differentiation trajectories of individual cancer cells in myeloproliferative neoplasms. *Cell Stem Cell* **28**, 514–523.e9 (2021).
8. N. Williams *et al.*, Life histories of myeloproliferative neoplasms inferred from phylogenies. *Nature* **602**, 162–168 (2022).
9. C. J. Watson *et al.*, The evolutionary dynamics and fitness landscape of clonal hematopoiesis. *Science* **367**, 1449–1454 (2020).
10. P. Hirsch *et al.*, Clonal history of a cord blood donor cell leukemia with prenatal somatic JAK2 V617F mutation. *Leukemia* **30**, 1756–1759 (2016).
11. W. J. Ewens, *Mathematical Population Genetics: Theoretical Introduction* (Springer, New York, 2004).
12. M. Kimmel, D. E. Axelrod, *Branching Processes in Biology* (Springer, New York, NY, 2015).
13. S. A. Sisson, Y. Fan, M. M. Tanaka, Sequential Monte Carlo without likelihoods. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 1760–1765 (2007).
14. T. Toni, D. Welch, N. Strelkowa, A. Ipsen, M. P. H. Stumpf, Approximate Bayesian computation scheme for parameter inference and model selection in dynamical systems. *J. R. Soc. Interface* **6**, 187–202 (2009).
15. H. W. Kuhn, The Hungarian method for the assignment problem. *Nav. Res. Logist.* **2**, 83–97 (1955).
16. J. Munkres, Algorithms for the assignment and transportation problems. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **5**, 32–38 (1957).
17. M. A. Beaumont, J.-M. Cornuet, J.-M. Marin, C. P. Robert, Adaptive approximate Bayesian computation. *Biometrika* **96**, 983–990 (2009).
18. M. Mosca *et al.*, Inferring the dynamic of mutated hematopoietic stem and progenitor cells induced by IFN α in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **138**, 2231–2243 (2021).
19. M. El-Khouy *et al.*, Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* **39**, 5323–5337 (2020).
20. S. Dupont *et al.*, The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera. *Blood* **110**, 1013–1021 (2007).
21. A. Tefferi *et al.*, Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. *Am. J. Hematol.* **89**, E121–E124 (2014).
22. A.-M. Lyne, L. Laplane, L. Perié, To portray clonal evolution in blood cancer, count your stem cells. *Blood* **137**, 1862–1870 (2021).
23. M. C. Florian *et al.*, Aging alters the epigenetic asymmetry of HSC division. *PLoS Biol.* **16**, e2003389 (2018).
24. S. Jaiswal *et al.*, Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2488–2498 (2014).
25. G. Genovese *et al.*, Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.* **371**, 2477–2487 (2014).
26. T. McKerrell *et al.*, Understanding Society Scientific Group, Leukemia-associated somatic mutations drive distinct patterns of age-related clonal hemopoiesis. *Cell Rep.* **10**, 1239–1245 (2015).
27. S. Hasan *et al.*, JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN α . *Blood* **122**, 1464–1477 (2013).
28. C. Benlabiod *et al.*, Calreticulin del52 and ins5 knock-in mice recapitulate different myeloproliferative phenotypes observed in patients with MPN. *Nat. Commun.* **11**, 4886 (2020).
29. P. Lundberg *et al.*, Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. *J. Exp. Med.* **211**, 2213–2230 (2014).
30. S. Anand *et al.*, Effects of the JAK2 mutation on the hematopoietic stem and progenitor compartment in human myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 177–181 (2011).
31. J. Poisson *et al.*, French national network for vascular liver diseases, Selective testing for calreticulin gene mutations in patients with splanchnic vein thrombosis: A prospective cohort study. *J. Hepatol.* **67**, 501–507 (2017).
32. N. Sousos *et al.*, In utero origin of myelofibrosis presenting in adult monozygotic twins. *Nat. Med.* **28**, 1207–1211 (2022).
33. S. Cordua *et al.*, Prevalence and phenotypes of JAK2 V617F and calreticulin mutations in a Danish general population. *Blood* **134**, 469–479 (2019).
34. A. Tefferi, J. Thiele, A. M. Vannucchi, T. Barbui, An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **28**, 1407–1413 (2014).
35. E. Rumi *et al.*, Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators, JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* **123**, 1544–1551 (2014).
36. H. Lee-Six *et al.*, Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature* **561**, 473–478 (2018).
37. M. Bentrion, A package for simulation, verification and parameter estimation of Chemical Reaction Networks. GitLab. <https://gitlab-research.centralesupelec.fr/2017bentrion/markovprocesses.jl>. Deposited 13 May 2022.
38. G. Hermange, Code for inferring initiation and development of Myeloproliferative Neoplasms. GitLab. <https://gitlab-research.centralesupelec.fr/2012hermange/mpn-development>. Deposited 15 June 2022.

ANNEXE N°4

Secreted Mutant Calreticulins As Rogue Cytokines in Myeloproliferative Neoplasms

Christian Pecquet^{1,2*}, Thomas Balligand^{1,2*}, Ilyas Chachoua^{1,2*}, Amandine Tisserand^{3-5*}, Nicolas Papadopoulos^{1,2}, Gaëlle Vertenoil^{1,2}, Anita Roy^{1,2}, Caroline Marty³⁻⁵, Harini Nivarthi⁶, Jean-Philippe Defour^{1,2}, Mira El-Khoury³⁻⁵, Eva Hug⁷, Erica Xu⁷, Oleh Zagrijtschuk⁸, Tudor E. Fertig⁹, Daciana S. Marta⁹, Heinz Gisslinger¹⁰, Bettina Gisslinger¹⁰, Martin Schalling¹⁰, Ilaria Casetti¹¹, Elisa Rumi¹¹, Daniela Pietra¹¹, Chiara Cavalloni¹¹, Luca Arcaini¹¹, Mario Cazzola¹¹, Norio Komatsu¹², Yoshihiko Kihara¹², Yoshitaka Sunami¹², Yoko Edahiro¹², Marito Araki¹³, Roman Lesyk^{14,15}, Veronika Buxhofer-Ausch^{16,17}, Sonja Heibl¹⁸, Florence Pasquier^{3-5,19}, Violaine Havelange^{2,20}, Isabelle Plo³⁻⁵, William Vainchenker³⁻⁵, Robert Kralovics^{21#} and Stefan N. Constantinescu^{1,2,22,23#}

¹Ludwig Institute for Cancer Research Brussels, Brussels, Belgium; ²Université catholique de Louvain and de Duve Institute, Brussels, Belgium; ³INSERM, Unité Mixte de Recherche 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France, ⁴Université Paris-Saclay, Unité Mixte de Recherche 1287, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ⁵Gustave Roussy, Unité Mixte de Recherche 1287, Villejuif, France, ⁶CeMM Research Center for Molecular Medicine of the Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria, ⁷MyeloPro Diagnostics and Research GmbH, Vienna, Austria, ⁸Dr. Oleh Zagrijtschuk, Zieglergasse 55/2/4, 1070 Vienna, Austria, ⁹Ultrastructural Pathology Lab and Bioimaging, Victor Babeş Institute of Pathology, Bucharest, Romania, ¹⁰Department of Internal Medicine I, Division of Hematology and Blood Coagulation, Medical University of Vienna, Vienna, Austria, ¹¹Division of Hematology, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo and University of Pavia, Pavia, Italy, ¹²Department of Hematology, Juntendo University Graduate School of Medicine, Japan, ¹³Department of Transfusion Medicine and Stem Cell Regulation, Juntendo University Graduate School of Medicine, Japan, ¹⁴ Department of Biotechnology and Cell Biology, Medical College, University of Information Technology and Management in Rzeszow, Sucharskiego 2, 35-225 Rzeszow, Poland, ¹⁵ Department of Pharmaceutical, Organic and Bioorganic Chemistry, Danylo Halytsky Lviv National Medical University, Pekarska 69, 79010, Lviv-10, Ukraine, ¹⁶Ordensklinikum Linz Elisabethinen, Department of Internal Medicine I with Hematology, Stem Cell Transplantation, Hemostaseology and Medical Oncology; Fadingerstrasse 1, 4020 Linz, Austria ¹⁷Johannes Kepler University Linz, Medical Faculty, Altenberger Strasse 69, 4040 Linz, Austria, ¹⁸Department of Internal Medicine IV, Klinikum Wels-Grieskirchen, Wels, Austria, ¹⁹Department of Hematology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France, ²⁰Department of Hematology, Cliniques universitaires Saint-Luc, Brussels, Belgium, ²¹Department of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Vienna, Austria, ²²Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology (WELBIO), Brussels, Belgium, ²³Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Medicine, Oxford University, Oxford, UK.

*co-first authors

#corresponding authors

Correspondence:

- Stefan N. Constantinescu, Ludwig Institute for Cancer Research Brussels. Avenue Hippocrate 74, UCL 75-4, Brussels B-1200, Belgium; e-mail:

Stefan.constantinescu@bru.licr.org; Tel: 322-764-75-40.

- Robert Kralovics, Department of Laboratory Medicine, Medical University of Vienna, Anna Spiegel Research Building, Lazarettgasse 14, AKH BT25.2, Level 6, Vienna, Austria; e-mail: robert.kralovics@myelopro.com; Tel: 43-(0)1-40400-73510.

Abstract

Mutant calreticulin (CALR) proteins resulting from a -1/+2 frameshifting mutation of the *CALR* exon 9 carry a novel C-terminal amino-acid sequence and drive the development of myeloproliferative neoplasms (MPNs). Mutant CALRs were shown to interact with and activate the thrombopoietin receptor (TpoR/MPL) in the same cell. We report that mutant CALR proteins are secreted and can be found in patient plasma at levels up to 160 ng/ml, with a mean of 25.64 ng/ml. Plasma mutant CALR levels correlated with mutated *CALR* allele burdens in patients. Recombinant mutant CALR proteins bound and activated the TpoR on cell lines and primary megakaryocytic progenitors from *CALR*-mutated patients where they drive Tpo-independent colony formation. By bioluminescence resonance energy transfer assay, we show that mutant CALR proteins produced in one cell can specifically interact *in trans* with the TpoR on a target cell. Cells that carry both TpoR and mutant CALR are hypersensitive to exogenous CALR mutant proteins in comparison to cells that only carry TpoR, and respond to levels of CALR mutant proteins similar to those in patient plasma. This is consistent with CALR mutated cells exposing at the cell-surface TpoR carrying immature N-linked sugars. Thus, secreted mutant CALR proteins will act more specifically on the MPN clone. In conclusion, a chaperone, CALR, can turn into a rogue cytokine through somatic mutation of its encoding gene.

Key Points

- 1) Mutant CALR proteins are secreted to the plasma of MPN patients, and can act as a rogue cytokine by activating the TpoR on neighboring cells.
- 2) TpoR-expressing cells with a *CALR* mutation are uniquely sensitive to the levels of circulating mutant CALR proteins seen in patients.

Introduction

Frameshifting (-1/+2) mutations in the exon 9 of the calreticulin (*CALR*) gene are responsible for 20-30% cases of essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) ^{1,2}. Belonging to the *BCR-ABL* negative myeloproliferative neoplasms (MPNs), ET and PMF are clonal malignancies of the hematopoietic system. The two major prevalent exon 9 frameshifting mutations of *CALR* are a 52 base-pair deletion (type-1: del52, c.1092_1143del) and a 5 base-pair insertion (type-2: ins5, c.1154_1155insTTGTC) ^{1,2}. The oncogenic mutant *CALR* protein has been shown to always result from a -1/+2 frameshifting mutation in the exon 9 of the *CALR* gene. This leads to a novel mutant C-terminal end-tail that is rich in positively charged and hydrophobic residues, unlike the wild-type *CALR* ³ and loses the endoplasmic reticulum (ER)-retention KDEL signal peptide.

We and others have shown that the mutant end-tail of *CALR* enables the specific pathological activation of the thrombopoietin receptor (TpoR) ⁴⁻¹⁰, which via the JAK-STAT pathway drives the proliferation of hematopoietic cells. Mutant *CALR* and TpoR complexes traffic through the secretory pathway to the cell surface ^{11,12}. *CALR* mutants require oligomerization in order to activate TpoR ^{12,13} and the first N-glycosylation site of TpoR at residue Asn117 to be present for oncogenic activation ⁴. Asn117 remains immature *N*-glycosylated at the cell surface due to *CALR* mutants shielding it from processing in the Golgi apparatus ¹². *CALR* mutants were reported by others and us to be circulating in the peripheral blood of patients suffering from *CALR* mutated MPNs or engineered mice ¹⁴⁻¹⁷. Wild-type *CALR* may also go to the cell surface under specific conditions, ^{11,18-21} or be secreted by macrophages to enhance phagocytosis of cancer cells ²².

Here we asked whether secreted mutant *CALRs* may act in a paracrine and/or autocrine fashion to activate the TpoR of adjacent cells and if this 'rogue cytokine' effect would be relevant to MPN pathogenesis.

Material and Methods

Plasma samples and allele burdens.

Plasma samples (148 MPN patients and 11 healthy controls) were collected through an international collaboration of clinicians from Austria, Italy and Japan after obtaining Ethical approval for each center. Mutated *CALR* allele burdens were evaluated by PCR fragment analysis. Statistical analyses were performed using GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

Antibodies

Phospho-specific antibodies and antibodies against receptors and signaling proteins were described in ⁴. Antibodies (SAT602) targeting the mutant *CALR* were from MyeloPro (Vienna, Austria). Antibody targeting the N-terminus of *CALR* (#ab195511) was from Abcam (Cambridge, MA).

ELISA

ELISA plates were coated with a polyclonal rabbit antibody (SAT602) that recognizes a peptide derived from the mutant *CALR* C-terminal sequence. After blocking (5% BSA + 0.05% Tween-20 in PBS), plates were probed with plasma samples diluted in blocking buffer. Purified mutant-*CALR* protein produced in Expi-293F cells (Thermo Fisher Scientific, Merelbeke, Belgium) was included as standard for quantification. For detection, an anti-*CALR* antibody (FMC75, Abcam, Cambridge, UK) in combination with an anti-mouse IgG-HRP antibody (Southern Biotech, Birmingham, AL) was used and TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, Thermo Fisher Scientific) was added as substrate. Absorbance was measured with a microplate reader (SpectraMax i3, Molecular Devices, Silicon Valley, CA) at 450 and 620nm. For measuring stability of recombinant human (rh) *CALR* del52, we incubated rh*CALR* del52 in either tissue culture medium or plasma from healthy control individuals for several periods at 37°C and then measured levels by using ELISA plates coated with a polyclonal rabbit anti-*CALR* mutant antibody (SAT602) and detected with a chicken monoclonal antibody raised against the C-terminal mutated tail in combination with an anti-chicken IgG-HRP antibody (Abcam, Cambridge, UK).

Cells

Ba/F3 cells and HEK cells were maintained as described ⁴. The CRISPR/Cas9 engineered Ba/F3 cells were described in ¹⁰. Primary cells were harvested from the bone marrow of a Knock-in *Calr*^{del52/WT} mouse model developed in our lab using a CRISPR/Cas9 approach ¹⁴.

Production of recombinant proteins

Recombinant human CALR wild-type and CALR del52 contain a N-terminal His tag sequence (MGSHHHHHGSSG) that replaces the CALR signal peptide sequence (aa1-17). Cys 163 was mutated to serine. The proteins were produced and purified as described previously ¹².

Transcriptional Assays

Dual luciferase assay was performed as described before ⁴ in Ba/F3 cell lines transiently transfected with Spi-Luc as a STAT5 activation reporter ²³ and pRL-TK as an internal control.

Western Blots and immunoprecipitation

Western blots were performed on NP40 extracts as described ⁴. For Western blots on plasma, we first used immunoprecipitation to enrich mutant CALR and remove the large amounts of albumin and immunoglobulins present in plasma. Anti-CALR mutant antibody (CAL2, Dianova) was purified with rProtein G prior to biotinylation using a commercial antibody biotinylation kit (Thermo Scientific, Merelbeke, Belgium). 100µl of plasma was incubated with 1:25 biotinylated anti-CALR mutant antibody (CAL2, Dianova) overnight and pull-down with Streptavidin-coated magnetic beads (DynaBeads MyOne Streptavidin C1, Thermo Scientific, Merelbeke, Belgium). Samples were washed 5 times with PBS and eluted with the elution buffer (Glycine 0.15M – HCl, pH 2.5) before analysis by western blotting in denaturing and reducing conditions with an anti-CALR mutant antibody (SAT602).

Immunoelectron microscopy

Cells were fixed using 4% paraformaldehyde, 0.5% glutaraldehyde and 1.4% sucrose (pH 7.4), then embedded in London Resin White (LR White) by manufacturer protocols (Agar Scientific, UK). Sections were labeled on-grid with a

primary antibody, then a gold-conjugated secondary at 1:250 dilution (gold size 0.8, 6 or 10 nm, Aurion, The Netherlands). Primary antibody was omitted for negative controls. Blocking was done with bovine serum albumin (0.2%) and a solution for goat antibodies (Aurion, The Netherlands). Micrographs were recorded using the 4k×4k Ceta camera of a Talos 200C transmission electron microscope (ThermoFisher Scientific), at 22000x to 36000x nominal magnification.

Megakaryocyte colony forming unit assay using human samples

CD34⁺ cells were purified from patient peripheral blood and cultured for 3 days in serum-free medium in presence of Tpo (20 ng/mL) (Kirin Brewery, Tokyo, Japan) and SCF (25 ng/mL) (Biovitrum AB, Stockholm, Sweden) (PMID: 8695846). CD34⁺CD41⁺ progenitors were sorted using anti-CD34-FITC, anti-CD41-PE and were cloned at 1 cell/well in 96 wells plate in serum-free medium without cytokine, with SCF only, with SCF + Tpo (20 ng/mL), with SCF ± rhCALR WT or SCF ± rhCALR del52. Megakaryocyte (MK) colonies were counted at day 5.

Written informed consent was obtained from patients in accordance with the Declaration of Helsinki and the study was approved from Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France IV- Institutional review board (agreement from US Department of Health and Human Services (n°IRB 00003835- Protocol 2015/59-NICB) and Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) (authorization #915663).

Proliferation assay (Celltiter-Glo assay)

Proliferation assays were performed as described ⁴.

NanoBRET assay and conditioned medium preparation

Our NanoBRET approach was described previously ¹². HEK293T cells transiently transfected with either a C-terminal CALR wild-type-HaloTag or CALR del52-HaloTag construct (**Supplemental Figure 4**) were cultured for 2 days in DMEM/F12 – 2% FBS (no phenol red) and the culture medium was harvested every 24 hours. The conditioned media were preincubated with 618-ligand (NanoBRET kit, Promega, Leiden, Netherlands) prior treatment of HEK293T cells transiently transfected with

either N-terminal Nano-Luciferase (NL)-TpoR or Nano-Luciferase (NL)-EpoR fusion constructs. Cells were kept in conditioned medium for one hour at 37°C before adding NanoGlo substrate (1 μ L/mL final) and reading for luminescence and BRET using a GloMax Discover system (Promega).

Results

CALR mutant proteins are detectable in the plasma of MPN patients and correlate with the status of disease

A total of 159 plasma samples from patients were analyzed by ELISA for presence of circulating mutant CALR proteins using a specific antibody that does not recognize non-mutated CALR (111 *CALR* mutated, 35 *JAK2* V617F positive, 2 triple-negative and 11 healthy controls). Soluble mutant CALR was detectable in 106 out of 111 *CALR* mutated patients with a mean level of 25.64 ng/mL. No signal was detected for *JAK2* V617F positive, triple negative patients or healthy controls (**Figure 1A**). The most represented CALR mutation was type1-del52 (64 patients), followed by type2-ins5 (33 patients). 14 less common mutations were also observed (1 patient for each variant). Grouping all the mutations in type1-like, type2-like and other mutations did not reveal any significant difference in the amount of soluble mutant CALR among the first two groups, but was significantly lower in patients carrying other types of mutations (**Figure 1B**). Interestingly, 4 out of 5 samples with non-detectable mutant CALR belong to patients carrying uncommon mutation types, del22, del1, type28, type34, as defined in ². Mutational CALR burden and clinical diagnosis data were available for 57 patients. From those, plasma levels of soluble mutant CALR were directly correlated to the allele burdens in the blood (**Figure 1C**). We observed that mutant soluble CALR levels were significantly higher in patients with a diagnosis of PMF and pre-PMF when compared to patients with a diagnosis of ET (**Figure 1D**).

Immunoelectron microscopy detects mutant CALR proteins in Golgi apparatus and secretory vesicles

The results above suggested that mutant CALRs are secreted by the MPN clone. While we established the presence of mutant CALR in the secretory pathway of cells that also express TpoR ¹² we asked whether CALR mutants are localized in the secretory pathway also in cells that only express CALR mutants, like myeloid or lymphoid cells of the mutated *CALR* clone. To this end we used transmission electron microscopy firstly on pro-B Ba/F3 cells expressing either CALR del52 or CALR WT tagged with a Flag sequence at the C-terminus in the absence of TpoR. Immunoelectron microscopy with anti-Flag and gold-conjugated secondary antibody showed that CALR-del52 localized in both the *cis*-Golgi and *trans*-Golgi

compartments, as well as in various vesicles distributed between the *trans*-Golgi network and the plasma membrane (**Figure 2A**). CALR WT was mostly localized in the ER and to a lower extent in the nucleus with very low levels in the *cis*- or *trans*-Golgi (**Figure 2B**).

We then turned to CRISPR-modified Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cells that express endogenous level of CALR mutant (described previously¹⁰). Using an anti-N terminus CALR antibody we noted plasma membrane labelling (**Figure 2C**), suggesting that secretion of CALR mutant is maintained in this cell line. In contrast, in control CRISPR cells, endogenous WT CALR localized mostly in the ER and perinuclear space, nucleus, and weakly in the Golgi (G) network (**Figure 2D**). Similar differences were observed in primary bone marrow cells from *Calr*^{del52/WT} KI mice and *Calr*^{WT/WT} controls with an anti-N-terminus antibody (**Figure 2E and F**). Finally, we confirmed these data using a mutant CALR specific antibody, SAT602 which detects the C-terminus of the mutant CALR del52. The antibody also demonstrated labelling of plasma membrane and vesicles between *trans*-Golgi network and plasma membrane, as well as ectosomes, in the Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cell line (**Figure 2G and H**) and primary bone marrow cells from *Calr*^{del52/WT} KI mice (**Figure 2I**).

We next tested *in vivo* whether secretion occurs only from TpoR cells or also from other cells of the clone. We used *Calr*^{del52/WT} KI mice that had been crossed with *Mpl*^{-/-} mice. Remarkably, while intracellular CALR del52 was strongly reduced in absence of TpoR, CALR del52 was still highly present in the plasma in mice lacking TpoR (**Figure 3A**). Taken together, these results show that secretion occurs also from cells that do not express TpoR, but belong to the clone.

Plasma CALR mutant proteins are stable in plasma and initiate proliferation of Ba/F3 expressing TpoR and mutant CALR in a rogue cytokine fashion

The presence of CALR mutant proteins in plasma raises the question of whether these proteins may also exert signaling on TpoR-expressing cells. We first measured half-life of plasma soluble CALR mutant after incubation at 37°C and detection by ELISA. Analysis revealed an average half-life of 426.3 min (**Figure 3B**) and immunoprecipitation followed by western blotting (see Methods) confirmed that CALR proteins were intact (**Figure 3C**, left panel) and quantification validated the levels detected by ELISA (**Figure 3C**, right panel).

To probe the ability of soluble CALR to induce cytokine-independent proliferation of Ba/F3 cells, we used recombinant CALR del52 and CALR WT (**Supplementary Figure 1A-B**) whose correct folding was verified by microscale thermophoresis (**Supplementary Figure 1C**). To define the amount of recombinant CALR that best mimicked plasma levels of CALR mutant found in patient plasma, we measured the half-life of rhCALR del52 in tissue culture medium. We found that rhCALR del52 half-life was over 10 times lower (30.57 min. in culture medium and 45.19 min. when added to plasma) than that of plasma CALR (426.3 min) (**Figure 4A and Supplementary Figure 1D-E**). These results suggest that CALR del52 is secreted possibly in complexes with proteins that may protect it from degradation in the plasma.

We then referred to basic pharmacokinetic equations to derive the single dose concentration that would best mimic a steady state concentration average similar to what is observed *in vivo*. The average plasma concentration (C_p) is given by the pharmacokinetic formula ²⁴:

$$(1) \quad C_p = \frac{1}{0.693} * F * D * t_{\frac{1}{2}} * \frac{1}{\tau}$$

Where F is the bioavailability, D is the dose, $t_{\frac{1}{2}}$ is the half-life and τ the dose interval.

The bioavailability was assumed to be maximum *in vitro* so that F = 1, half-life was determined experimentally and dose interval was set at $\tau = 24$ h. Supplemental Table 1 gives the relationship between single dose treatment and corresponding average concentration (C_p) over the experimental timeframe. In comparison, recombinant truncated human Tpo (rhTpo) commonly used in *in vitro* assays is similar to that described in ²⁵ with a half-life of 1.56 h. A single dose of rhTpo of 10 ng/ml over 24 h thus has a C_p of 0.94ng/ml, slightly above the range of plasma Tpo detected in healthy control (0.108-0.506 ng/ml) ²⁶.

Based on the above results, we used several concentrations of CALR del52 from 0.01 μ g/ml ($C_p = 0.30$ ng/ml) to 100 μ g/mL ($C_p = 3\mu$ g/ml) with a dosing interval of 24h. Using this approach, we measured proliferation of Ba/F3 cells at 72 h by using the Celltiter-glo (CTG) assay. Remarkably, we could detect a significant increase already at 0.01 μ g/mL ($C_p = 0.30$ ng/ml) and a dose-dependent increase up to 100 μ g/mL ($C_p = 3\mu$ g/ml) (**Figure 4B**) in Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} ¹⁰ but not in Ba/F3 parental or Ba/F3 TpoR *Calr*^{wt} that do not express mutant CALR. Cells that co-express TpoR and a

CALR mutant are thus hyper-sensitive to exogenous mutant proteins compared to cells that only express wild-type endogenous CALR. The ability of rhCALR del52 to induce proliferation Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} was further confirmed by thymidine incorporation experiment (**Supplementary Figure 2A**).

Low levels of soluble CALR mutants are able to induce JAK-STAT signaling by selectively activating TpoR at the cell surface of *Calr* mutated cells

To measure specifically the activation of the JAK-STAT pathway, we transfected the Spi-Luc luciferase STAT5 reporter²³ in Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut}, Ba/F3 TpoR *Calr*^{wt} or parental Ba/F3 cells and measured STAT5 activation 24h after stimulation with rhCALR del52. In Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cells we could detect a dose-dependent STAT5 activation by rhCALRdel52 starting at 0.1 µg/mL ($C_p = 3$ ng/ml) (2-fold) and a plateau (4 fold) achieved at 1 µg/ml ($C_p = 30$ ng/ml), as compared to vehicle (**Figure 4C, upper panel**). The activity induced by 1 µg/ml of rhCALR del52 was comparable to stimulation by 10 ng/ml of Tpo ($C_p = 0.94$ ng/ml). In sharp contrast, Ba/F3 TpoR *Calr*^{wt} required a considerably higher concentration of rhCALR del52 (100 µg/ml, $C_p = 3$ µg/ml) in order to detect a 2.5-fold increased STAT5 activation, thus a 1,000-fold difference in sensitivity (**Figure 4C, middle panel**) and parental Ba/F3 cells were not stimulated by rhCALR del52 (**Figure 4C, lower panel**). Surprisingly, we could detect a 1.5 to 2-fold increased STAT5 activation upon stimulation of Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cells with 10 to 100 µg/ml of rhCALR WT respectively, thus a 100- to 1,000-fold difference when compared to rhCALR del52 (**Figure 4C, upper panel**). CALR WT might be interacting with surface bound complexes of TpoR and CALR mutant proteins and stabilizing them, possibly pointing to a potential low intrinsic affinity of CALR globular domain to TpoR.

Next, we confirmed the activation of the JAK-STAT pathway by western blot by detection of phosphorylated STAT5, ERK1/2 and phosphorylated tyrosine 626 of the intracellular domain of TpoR²⁷, in Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cells post-stimulation by 0.1 µg/mL ($C_p = 3$ ng/ml) for several time points (**Figure 4D**). Ba/F3 parental cells did not show any such response up to 100 µg/mL ($C_p = 3$ µg/ml) rhCALR del52 concentration (**Supplemental Figure 3A**).

Finally, we harvested megakaryocytic (CD41⁺) cells harboring a heterozygous *Calr* del52 mutation from the bone marrow of *Calr*^{del52/WT} knock-in mice¹⁴

(**Supplementary Figure 3B**) and subjected them to Western blotting after stimulation for 30 min with rhCALR del52 or the vehicle control (**Supplementary Figure 3C**). Upon stimulation of these cells with 10 µg/ml ($C_p = 300$ ng/ml) of rhCALR del52, we detected an increased phospho-STAT5 signal when compared to the vehicle condition, showing that exogenous CALR mutant proteins effectively activate the TpoR of primary *Calr*^{del52/WT} cells.

Soluble CALR mutant proteins are able to directly interact with TpoR at the cell surface

In a previous study we provided evidence that when mutant CALR and TpoR are co-expressed in the same cell, a direct *cis* interaction can be documented either by Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) or by size-exclusion chromatography¹². We used our previously published NanoBRET constructs¹² and set-up a separated cell culture system where conditioned media containing free CALR-HaloTag proteins are added to recipient HEK293T cells transiently expressing a Nano-luciferase (NL) tagged receptor (**Figure 5A**). Both construct types were verified to be properly expressed and/or secreted in the culture medium and to recapitulate the signaling properties of the original protein (**Supplementary Figure 4**). In this configuration, we detected a significantly higher BRET ratio with the addition of CALR del52-HaloTag containing medium to the NL-TpoR recipient cells, compared to the addition of CALR WT-HaloTag containing medium (**Figure 5B**). This did not occur with NL-EpoR recipient cells, as CALR mutants do not activate EpoR⁴. Similar observations were reproduced in a co-culture assay, where HEK293T cells were separately transiently transfected 24 hours before co-culture, so that the HaloTag construct transfected cells continuously secrete CALR-HaloTag that can bind the NL-TpoR of the other cells (**Figure 5C**). Interestingly, in this assay we included the expression of CALR ins5-HaloTag, which shows an interaction with NL-TpoR that lies halfway between that of CALR del52-HaloTag and that of CALR WT-HaloTag. This is consistent with previous finding that CALR ins5 is able to activate TpoR but to lower level than CALR del52⁴. To confirm that the differences observed were not attributable to a difference of transfection and/or expression of our constructs, we retrovirally transduced HEK293 cells with either NL-TpoR or a CALR-HaloTag and sorted each cell type for the same level of expression of the selection marker (see Methods). By co-culture of these cells, we confirmed that CALR del52-

HaloTag has a stronger interaction with NL-TpoR *in trans* than that of CALR WT-HaloTag (**Figure 5D**).

Recombinant CALR del52 is able to enhance the differentiation of human megakaryocyte progenitors *ex vivo*

Next, we sought to validate the cytokine effect of rhCALR del52 in primary cells from patients with MPN carrying *CALR* mutations, or *JAK2* V617F or healthy controls. We isolated CD34⁺CD41⁺ cells and performed megakaryocyte (MK) colony assays in the absence or presence of rhCALR del52 in medium containing KIT ligand (SCF) and lipids, insulin-transferrin and BSA (see Methods).

In the first set of assays, we used a single dose of 20 µg/mL ($C_p = 120$ ng/ml over 5 days) recombinant CALR del52. In these conditions, we observed that recombinant CALR del52 significantly increased the number of MK colonies, while CALR WT did not (**Figure 6B**). Importantly, rhCALR del52 did not increase the number of MK colonies for *JAK2* V617F patients or for healthy controls (**Figure 6C-D**). In an alternative strategy, we added a lower amount of rhCALR del52 daily to mimic *in vivo* conditions where CALR del52 is continuously produced and to partially compensate the rapid disappearance of the recombinant protein. To this end we added daily for 4 days either 0.1 µg/ml ($C_p = 3$ ng/ml); 1 µg/ml ($C_p = 30$ ng/ml) or 5 µg/ml ($C_p = 150$ ng/ml). We could detect a significant increase in Tpo-independent MK colonies in the condition of 5 µg/ml ($C_p = 150$ ng/ml) of rh CALR del52, and a trend in the condition of 1 µg/ml ($C_p = 30$ ng/ml) (**Figure 6E**). Taken together our data indicate that at levels comparable to the levels detected in patients, recombinant CALR del52 induces a significant increase in MK colony formation.

Discussion

Here we show that MPN patients that harbor *CALR* driver mutations exhibit plasma levels of mutant CALR proteins that correlate with the mutated *CALR* allele burdens. Such secreted CALR mutant proteins can act as rogue cytokines to activate TpoR/JAK-STAT signaling in cell lines, patient primary cells and mouse myeloid progenitors of *Calr*^{del52/WT} knock-in mice. This finding raises the possibility of using the level of circulating CALR mutant proteins as a biomarker and risk-stratification of

CALR-mutated MPNs. Indeed, the mean levels of circulating CALR mutants significantly differ between ET and (pre)-MF patients.

To our knowledge, this work is the first to demonstrate that circulating CALR mutant proteins can exert a 'rogue cytokine' activity on cells that express the TpoR. Cells that carry an oncogenic mutation of CALR are more sensitive to levels of exogenous CALR mutant proteins close to those detected in patient plasma. This can be explained as only cells expressing endogenous mutant CALR will expose at the cell-surface TpoR with immature (high mannose) N-glycosylation¹² required for binding to the lectin domain of CALR^{28,29}. We propose a model where mutant CALR proteins are secreted from CALR-mutated cells, including cells from the clone that do not express TpoR, and can enhance the activation of the TpoR of a nearby CALR-mutated cell in a paracrine fashion (**Figure 7**). This model would apply to the bone marrow niche where levels can be higher than in plasma.

The difference in half-lives between plasma CALR mutants and recombinant CALR mutant proteins in human plasma or culture medium indicate that upon secretion the mutant CALR proteins are in complexes with other proteins that stabilize them. These proteins cannot be replaced by normal plasma proteins as shown by our testing of recombinant CALR del52 in normal plasma *in vitro*. These complexes are unlikely to be masking the key residues required for signaling. In fact, we recently showed in a companion manuscript that plasma CALR proteins are present in complexes with the extracellular domain of the transferrin receptor 1, which strongly increases the half-life of CALR mutant proteins without preventing its rogue cytokine effect via TpoR³⁰. We isolated such complexes using an antibody to the C-terminus of mutant CALR³⁰. Such an antibody when injected *in vivo* was able to detect and remove circulating mutant CALR and to reduce platelet numbers in a mouse model of MPN represented by KI of a chimeric murine-human CALR del52, where the tail of CALR del52 was from the human sequence³¹.

Recently, levels of secreted CALR (wild-type and mutant) were assessed in knock-in models^{14,17,31} and MPN patient plasma¹⁶ and are in agreement to ours. Remarkably, such secreted CALR exerted profound consequences on the immune response¹⁶. Our data suggest that removing the circulating CALR mutant proteins may give an effect on the phenotype of the MPN disease.

The finding that CALR mutant proteins act as rogue cytokines may open new perspectives for treating patients that are suffering from CALR-mutated MPNs.

Acknowledgements

We thank Dr. Didier Colau for protein production and purification and guidance with respect to recombinant protein usage, Lidvine Genet for expert technical support, and Dr. Nicolas Dauguet for flow cytometry assistance. AR was supported by de Duve Institute Morange Funds postdoctoral fellowship and by a FRS-FNRS fellowship. TB was supported by a PhD Télévie fellowship. SNC is Honorary Research Director at FRS-FNRS Belgium. NP has received an FSR PhD Fellowship from Université catholique de Louvain and an Aspirant PhD Fellowship from the FRS-FNRS, Belgium.

Funding to SNC is acknowledged from Ludwig Institute for Cancer Research, Fondation contre le cancer, Salus Sanguinis and Fondation “Les avions de Sébastien”, projets Action de recherché concertée (ARC) 16/21-073, Projet de recherche FNRS n°T.0043.21 and WelBio F 44/8/5 - MCF/UIG – 10955. The study was funded by grants from the Austrian Science Fund (P34451-B) and the Österreichische Forschungsförderungsgesellschaft (FFG) to RK. Studies conducted at the University of Pavia were supported by a grant from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), MYNERVA project #21267 to MC.

The work of VW, IP, AT, MEK, CM was funded by the Ligue Nationale contre le Cancer (équipe labellisée 2019), INCA PLBIO 2016 and 2021 (IP), and from the INSERM. Labex GR-Ex (IP, WV) is funded by the program “Investissements d’avenir”. AT was supported by the university Paris-Diderot (MENRT grant) and then La ligue Nationale contre le cancer.

The work of TEF and DSM was supported by the Romanian Ministry of Education Research and Innovation, under grant number PN 19.29.01.02/2019.

Authorship contributions

CP, TB, IC, AT planned paper strategy, performed experiments, interpreted data and wrote the paper; CP, IC, GV, JPD planned and performed transcriptional experiments, CP performed and functional murine cell lines and primary cell

experiments, TB planned and performed BRET experiments, NP performed CALR mutant protein characterization from patient and primary mouse model plasmas, EH, EX, OZ, RK performed study on patient plasma, EF and DSM performed immunoelectron microscopy, HG, BG, MS, IC, ER, DP, CC, LA, MC, NK, YK, YS, YE, MA, VBA, SH, VH selected patients, characterized allele burdens for MPN driver mutations and interpreted data on plasma levels of CALR mutants in the context of type of mutation, allele burden and MPN subtype. AT, MEK, CM performed megakaryocytic colonies from CALR-mutated patients and IP and VW supervised and analyzed these experiments. SNC, RK and WV planned research interpreted data and wrote the paper.

Conflict of Interest

RK and SNC and are co-founders of MyeloPro GmbH.

References

1. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391-2405.
2. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2379-2390.
3. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal.* 2009;417(3):651-666.
4. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood.* 2016;127(10):1325-1335.
5. Nivarthi H, Chen D, Cleary C, et al. Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants. *Leukemia.* 2016;30(8):1759-1763.
6. Elf S, Abdelfattah NS, Baral AJ, et al. Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. *Blood.* 2018;131(7):782-786.

7. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov.* 2016;6(4):368-381.
8. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood.* 2016;127(10):1317-1324.
9. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2016;127(10):1307-1316.
10. Balligand T, Achouri Y, Pecquet C, et al. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia.* 2016;30(8):1775-1778.
11. Han L, Schubert C, Kohler J, et al. Calreticulin-mutant proteins induce megakaryocytic signaling to transform hematopoietic cells and undergo accelerated degradation and Golgi-mediated secretion. *J Hematol Oncol.* 2016;9(1):45.
12. Pecquet C, Chachoua I, Roy A, et al. Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *Blood.* 2019;133(25):2669-2681.
13. Araki M, Yang Y, Imai M, et al. Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation. *Leukemia.* 2018.
14. Balligand T, Achouri Y, Pecquet C, et al. Knock-in of murine Calr del52 induces essential thrombocythemia with slow-rising dominance in mice and reveals key role of Calr exon 9 in cardiac development. *Leukemia.* 2020;34(2):510-521.
15. Pecquet C, Balligand T, Chachoua I, et al. Secreted Mutant Calreticulins As Rogue Cytokines Trigger Thrombopoietin Receptor Activation Specifically in CALR Mutated Cells: Perspectives for MPN Therapy. *Blood.* 2018;132(Suppl 1):4.
16. Liu P, Zhao L, Loos F, et al. Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells. *Molecular cell.* 2019.
17. Benlabiod C, Cacemiro MdC, Nédélec A, et al. Calreticulin del52 and ins5 knock-in mice recapitulate different myeloproliferative phenotypes observed in patients with MPN. *Nature Communications.* 2020;11(1):4886.

18. Dupuis M, Schaerer E, Krause KH, Tschopp J. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*. 1993;177(1):1.
19. Eggleton P, Lieu TS, Zappi EG, et al. Calreticulin Is Released from Activated Neutrophils and Binds to C1q and Mannan-Binding Protein. *Clinical Immunology and Immunopathology*. 1994;72(3):405-409.
20. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, et al. C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and Cd91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(6):781-796.
21. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, et al. Cell-Surface Calreticulin Initiates Clearance of Viable or Apoptotic Cells through trans-Activation of LRP on the Phagocyte. *Cell*. 2005;123(2):321-334.
22. Feng M, Chen JY, Weissman-Tsukamoto R, et al. Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(7):2145-2150.
23. Wood TJ, Sliva D, Lobie PE, et al. Specificity of transcription enhancement via the STAT responsive element in the serine protease inhibitor 2.1 promoter. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;130(1-2):69-81.
24. Rowland M, Tozer TN. *Clinical pharmacokinetics/pharmacodynamics*. Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia; 2005.
25. Thomas GR, Thibodeaux H, Errett CJ, et al. In Vivo Biological Effects of Various Forms of Thrombopoietin in a Murine Model of Transient Pancytopenia. *Stem Cells*. 1996;14(S1):246-255.
26. Zhao X, Feng X, Wu Z, et al. Persistent elevation of plasma thrombopoietin levels after treatment in severe aplastic anemia. *Exp Hematol*. 2018;58:39-43.
27. Drachman JG, Millett KM, Kaushansky K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13480-13484.
28. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal*. 1999;344 Pt 2:281-292.
29. Kapoor M, Ellgaard L, Gopalakrishnapai J, et al. Mutational analysis provides molecular insight into the carbohydrate-binding region of calreticulin: pivotal

roles of tyrosine-109 and aspartate-135 in carbohydrate recognition.

Biochemistry. 2004;43(1):97-106.

30. Papadopoulos N, Pecquet C, Nédélec A, Havelange V, Vertommen D, Constantinescu SN. Transferrin Receptor 1: A Novel Partner of CALR Mutant Proteins in Myeloproliferative Neoplasms. *Blood*. In press.
31. Achyutuni S, Nivarthi H, Majoros A, et al. Hematopoietic expression of a chimeric murine-human CALR oncoprotein allows the assessment of anti-CALR antibody immunotherapies in vivo. *Am J Hematol*. 2021;96(6):698-707.

Figure legends

Figure 1:

Quantification of mutant-CALR in plasma MPN patients and correlation of their levels to the disease state.

(A) Quantification of free CALR mutant proteins in the plasma from MPN patients, separated by their mutational status, assayed by ELISA. Red bars represent mean \pm Standard Deviation (SD). (B) Same ELISA results for *CALR*-mutated patients as shown in A, separated according to their mutation type. Red bars represent mean \pm SD. **C.** XY plot of the allele burden of each patient by their level of free plasmatic mutant CALR. A linear regression was applied and shows a statistically significant correlation between the two parameters. **D.** Same ELISA results for *CALR*-mutated patients as shown in A, represented as a box and whisker plot, arranged according to their disease status. All statistical analysis (using the Prism6 software) were performed by the unpaired t-test.

Figure 2:

Immuno-electron microscopy of CALR.

(A) In Ba/F3 cells, Flag-tagged CALR-del52 localized in both the cis-Golgi (cG) and trans-Golgi (tG) compartments (blue arrows), as well as vesicles distributed between the trans-Golgi network and the plasma membrane (blue circles), suggesting it

follows the secretory pathway to the cell surface. (B) By contrast, Flag-tagged CALR WT predominantly localized in the endoplasmic reticulum (ER) and nuclear heterochromatin (yellow arrows) and was less frequent in the Golgi network (cG, tG). (C) In cytokine-independent, proliferating CRISPR-modified Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cells, which expressed both CALR-del52 as well as endogenous CALR, anti-N terminus labeling was frequently observed at the plasma membrane (blue circles), suggesting CALR secretion is maintained in this cell line. (D) In control CRISPR Ba/F3 TpoR *Calr*^{wt} cells, endogenous CALR localized mostly in the nucleus (N), perinuclear space and endoplasmic reticulum (ER, yellow arrows) and the Golgi (G) network. (E) In primary *Calr*^{del52/WT} KI mouse bone marrow cells, N-terminus labeled CALR could be detected within the Golgi network (not shown), as well as at the plasma membrane (blue circles), suggesting secretion of CALR is maintained in these cells. (F) In control *Calr*^{WT/WT} mouse bone marrow cells, endogenous CALR was mostly localized at the endoplasmic reticulum (ER) and the nucleus (N). (G) When using a mutant-specific anti-CALR antibody labeling could be detected in the Golgi network of CRISPR-modified Ba/F3 TpoR *Calr*^{mut} cells (G, blue arrows), but also at the plasma membrane (H), including associated with ectosomes (blue circles). (I) Similarly, the mutant specific antibody identified CALR del52 in the secretory pathway of *Calr*^{del52/WT} KI mouse bone marrow cells (blue arrows and circles). Gold particle size is on average 0.8 nm in (A) and 6 or 10 nm in (B-I). m– mitochondria.

Figure 3:

Secretion and stability of plasma CALR del52 in *Calr* del52/WT KI mouse and human MPN patients.

(A) Immunoprecipitation of murine plasma CALR del52 and Whole blood lysates. Secretion rate of CALR del52 was evaluated by comparing the cellular and plasmatic CALR del52 levels from blood of KI-*Calr*^{del52/wt} mice expressing or not TpoR.

(B) Stability study of CALR mutant in plasma from MPN patients harboring CALR del52 mutant. Eight samples from MPN patients harboring CALR del52 mutant maintained at 37°C for various time points were measured in duplicate by ELISA and analyzed using a one-phase decay model (Prism6) to determine the averaged half-life (t1/2) and the Coefficient of determination (R2). Error bars represent standard deviations.

(C) CALR mutant proteins after immunoprecipitation in various MPN patients (left) and CALR mutant proteins of the same patients detected by ELISA (right).

Figure 4

Exogenous CALR del52 is inducing cell growth and JAK/STAT signaling in Ba/F3 expressing TpoR and mutant CALR.

(A) Stability study of recombinant human CALR del52 cell culture medium. Six samples maintained at 37°C for various time points were measured in duplicate by ELISA and analyzed using a one-phase decay model (Prism6) to determine the averaged half-life ($t_{1/2}$) and the Coefficient of determination (R^2). Error bars represent standard deviations.

(B) Short term proliferation of parental Ba/F3 and stable Ba/F3 expressing the indicated constructs were analyzed after daily exposition of the indicated doses of rhCALR del52 during 72h with CTG assay (Promega). Values shown represent the average of 5 experiments with at least 29 biological replicates \pm SEM. Statistical analysis (Jmp pro14) was performed by the non-parametric multiple comparisons Steel's test with a control group (vehicle). *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$.

(C) Ba/F3 TpoR *Calr^{mut}* (top), Ba/F3 TpoR *Calr^{WT}* (middle) and Ba/F3 parental (bottom) cells were transiently transfected with the Spi-Luc luciferase STAT5 reporter and the internal control pRL-TK used for normalization. The cells were cultured with different concentrations of recombinant human CALR del52 or CALR WT during 24h before performing a dual-luciferase assay for STAT5 transcriptional activity.

(D) Ba/F3 TpoR *Calr^{mut}* cells transfected with Spi-Luc and pRL-TK were treated during 24 h with the indicated concentrations of recombinant human or murine CALR del52 and STAT5 transcriptional activity was measured by Dual Luciferase assay (Promega). (C-D) Luciferase activity is normalized to vehicle condition (\emptyset). Values shown represent the average of 9 to 12 biological replicates \pm SEM. Statistical analysis (Jmp pro14) was performed by the non-parametric multiple comparisons Steel's test with a control group (\emptyset). *** = $p < 0.001$, ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$. Statistical analysis of two specific conditions (see dashed lines) were performed by the unpaired t-test.

(E) Western blots showing time-dependent phosphorylation of TpoR, STAT5 and ERK1/2 in Ba/F3 TpoR *Calr^{mut}* treated or not with 0.1 µg/mL of rhCALR del52 for various times (5, 10, 15, 30, 45, 60 min). P-Y626-TpoR denotes phosphorylation of tyrosine residue 112 of the intracellular chain of TpoR. HA denotes detection of total HA-tagged TpoR.

Figure 5:

BRET between exogenous CALR and cell-surface bound cytokine receptors.

(A) Cartoon representation of our exogenous CALR, separated cell culture NanoBRET setup. H: Halo-Tag, fused to the C-term of CALR. NL: Nano-luciferase, fused to the N-term of TpoR. 618-ligand: fluorescent molecule with very high affinity for HaloTag. The circle represents a BRET phenomenon that occurs only when the energy donor (NL) is within 10 nm of the energy acceptor (618-ligand). (B) BRET detection between exogenous CALR-HaloTag and cell-surface Nano-luciferase-cytokine receptor in a separate cell culture assay. The X-axis title show what conditioned medium was added to the recipient cells. Vehicle means conditioned medium from HEK293 cells transfected with an empty pcDNA3.1 vector. Each color represents a different recipient cell type that co-expresses either NL-TpoR or NL-EpoR. For each sample, recipient cells were incubated 1 hour with conditioned medium before reading luminescence. Data from 4 independent experiments were pooled and values were normalized to the vehicle, NL-TpoR condition. Statistical analysis (Jmp pro14) was performed by the non-parametric multiple comparisons Steel's test with a control group (CALR WT-Halo condition), *p*-values are shown above and those above 0.05 are between brackets. (C) BRET detection between CALR-HaloTag and cell-surface Nano-luciferase-TpoR in cell co-culture assay. Each cell population was separately transiently transfected 24 hours before washing and co-culture. The X-axis denotes what HaloTag construct is expressed, secreted HaloTag means an unfused HaloTag protein modified to have a signal sequence for secretion. For each condition, cells were co-cultured overnight in the presence of the 618-ligand before reading for luminescence the next day. Data from 3 independent experiments were pooled and values were normalized to the secreted HaloTag, NL-TpoR condition. Statistical analysis (Jmp pro14) was performed by the non-parametric multiple comparisons Steel's test with a control group (CALR WT-Halo

condition), *p*-values are shown above. (D) BRET detection between CALR-HaloTag and cell-surface Nano-luciferase-TpoR in a stable cell co-culture assay. HEK293 cells stably expressing either CALR WT or del52-HaloTag were co-cultivated overnight in presence of 618-ligand with HEK293 cells stably expressing NL-TpoR. Data from 3 independent experiments were pooled and values were normalized to the NL-TpoR & CALR WT-Halo condition. Statistical analysis (Jmp pro14) was performed by a two-tailed student's t-test and *p*-value is shown above.

Figure 6: Induction of differentiation of megakaryocyte progenitors by CALR del52

(A) Stability study of recombinant human CALR del52 CFU-MK culture medium. Six samples maintained at 37°C for various time points were measured in duplicate by ELISA and analyzed using a one-phase decay model (Prism6) to determine the averaged half-life (*t*_{1/2}) and the Coefficient of determination (*R*²). Error bars represent standard deviations.

CD34+CD41+ progenitors from four to six CALR-mutated patients (B), three JAK2 V617F patients (B) and three normal controls (C) were sorted and cloned at 1 cell/well in 96 well plates in serum-free medium containing SCF and treated with a single dose large dose of CALR del52. Percentages of MK colonies were calculated compared to the Tpo condition. Results are shown as mean ± SEM. **** = *p* < 0.0001, *** = *p* < 0.001. (one-way ANOVA, Holm-Sidak's multiple comparisons test).

(D) Effect of daily treatment of CALR del52 (0.1, 1, 5 µg/mL) on MK colonies formation. CD34+CD41+ progenitors from four CALR-mutated patients were tested and the percentages of MK colonies were calculated compared to the Tpo condition. Results are shown as mean ± SEM. ** represents significant difference *p*<0.01 (one-way ANOVA, Holm-Sidak's multiple comparisons test).

Figure 7:

Free CALR del52 acts as a rogue cytokine by stimulating the TpoR present at the cell surface of CALR-mutated cells.

Shown is a model of two CALR-mutated cells that express and secrete CALR mutants (plain black arrows and orange/purple circles). These may activate the TpoR

(blue homodimeric receptor) on the cell surface, in an autocrine or paracrine fashion (dashed black arrows). TpoR activation leads to JAK-STAT pathway of the cells (STAT5 represented as a green protein) and enhanced proliferation of the *CALR*-mutated cell. *Graphic representation uses elements available from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>) under the Creative Commons attribution 3.0 unported license.*

Figure 1

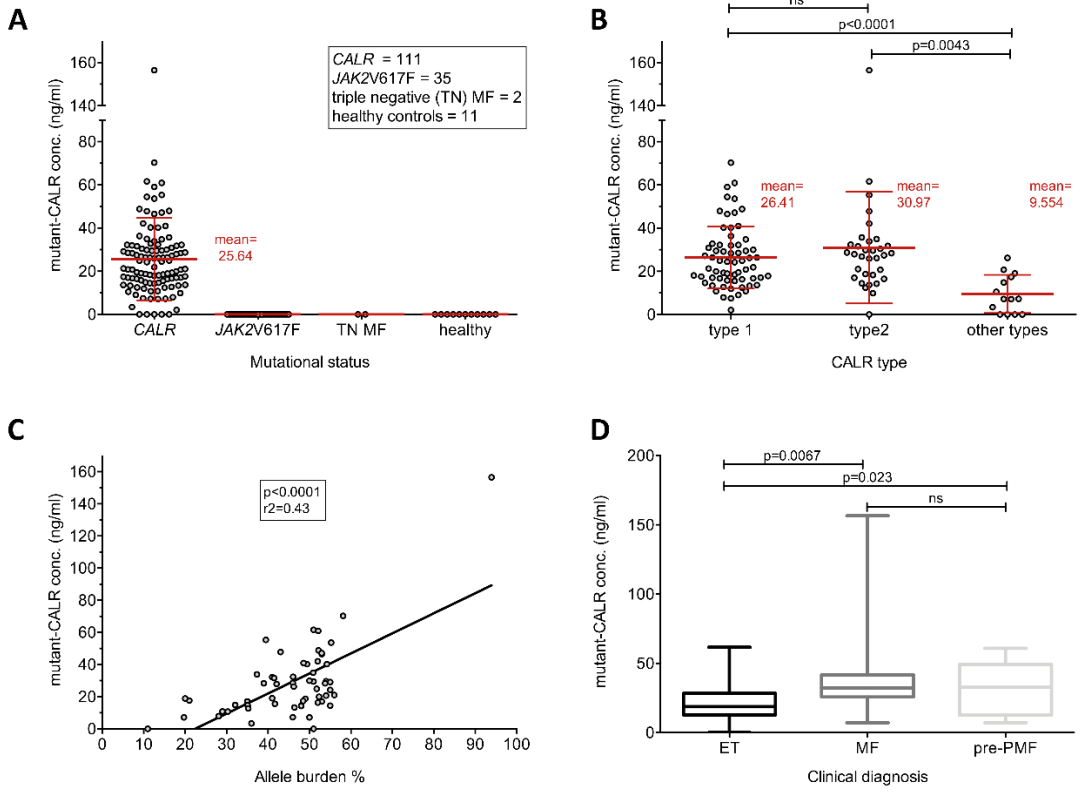


Figure 2

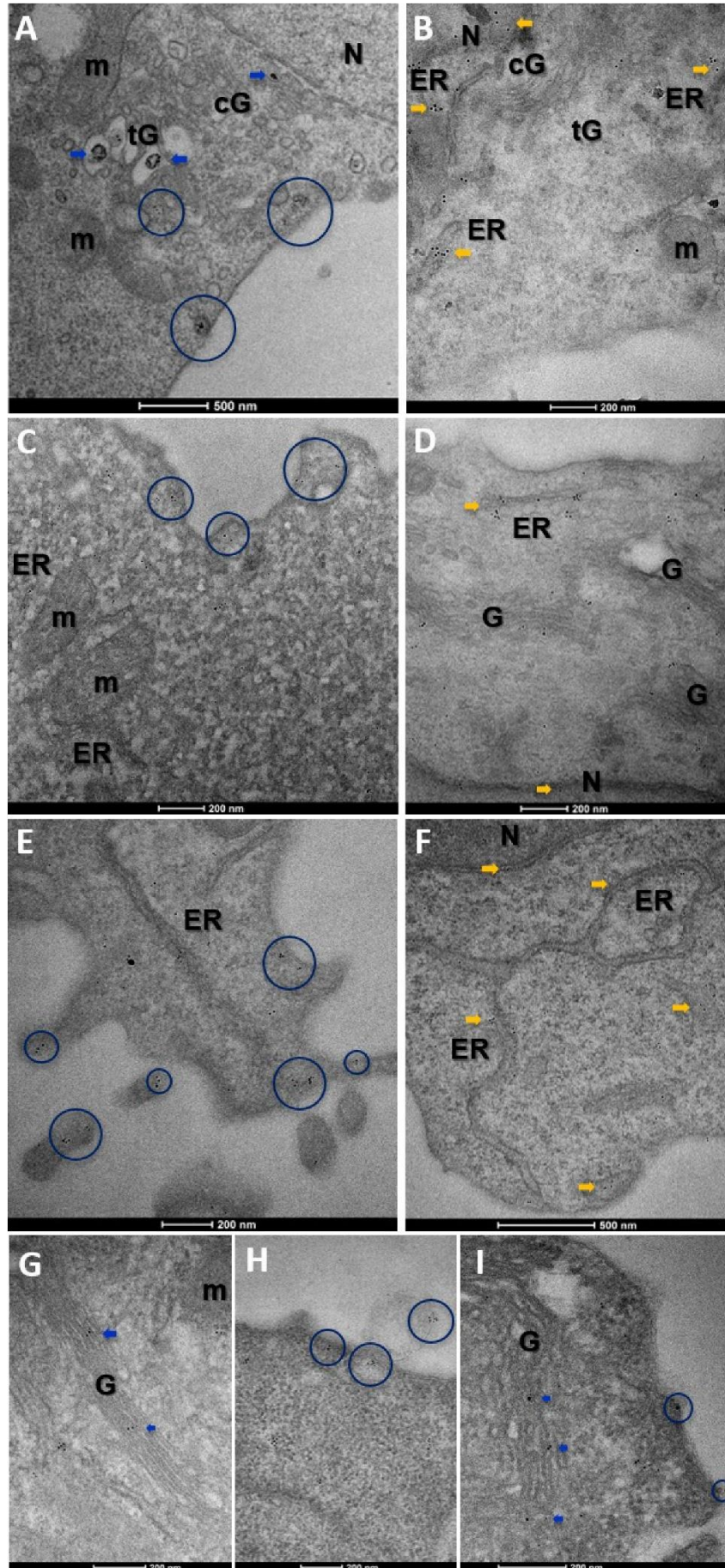
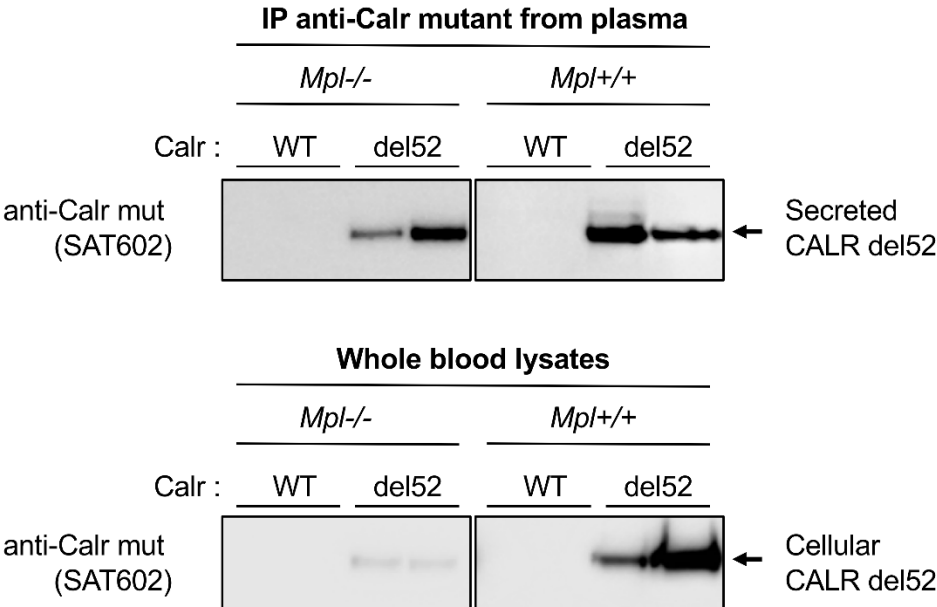
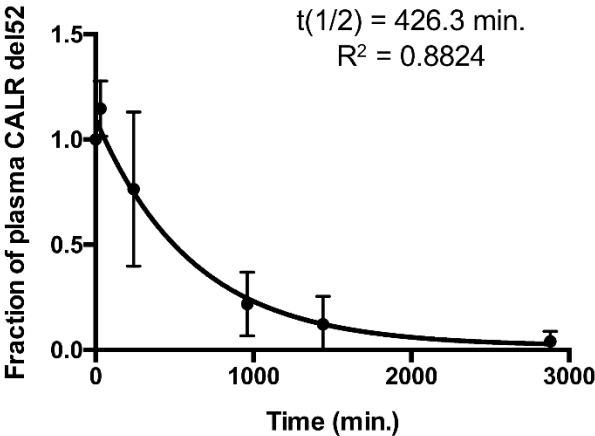


Figure 3

A



B



C

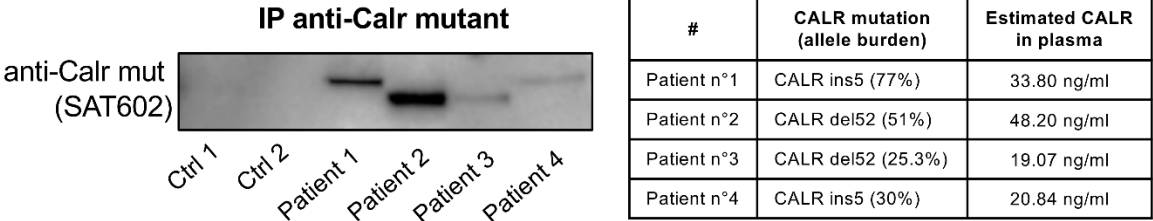


Figure 4

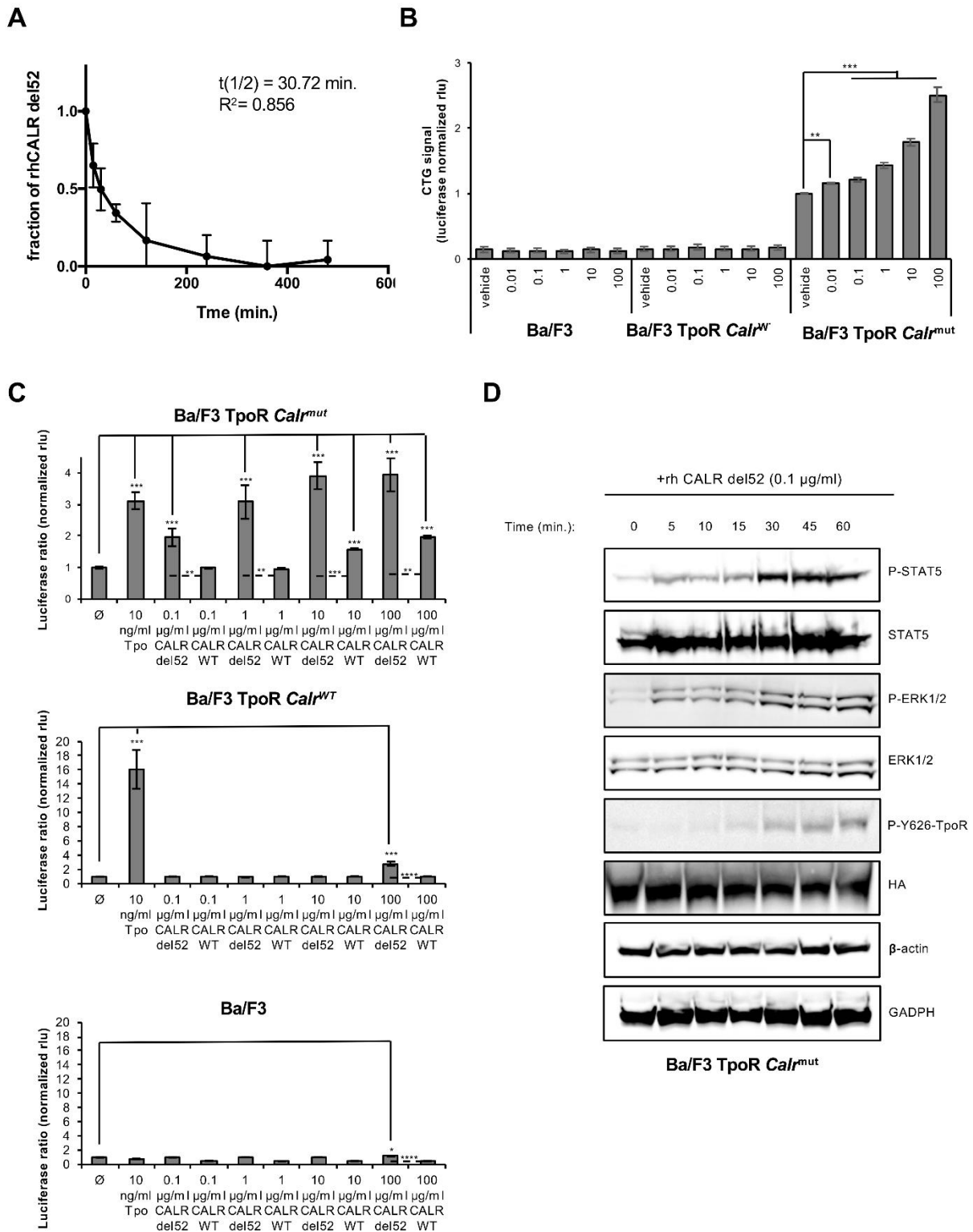


Figure 5

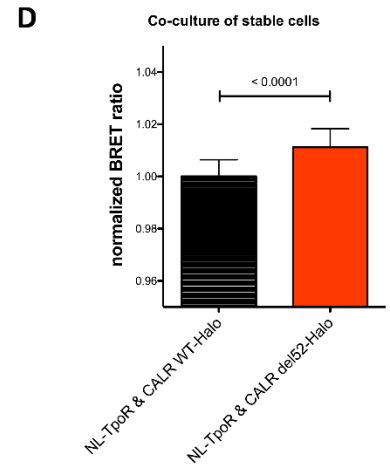
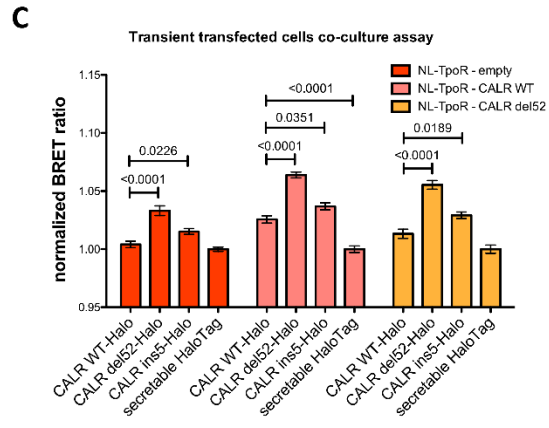
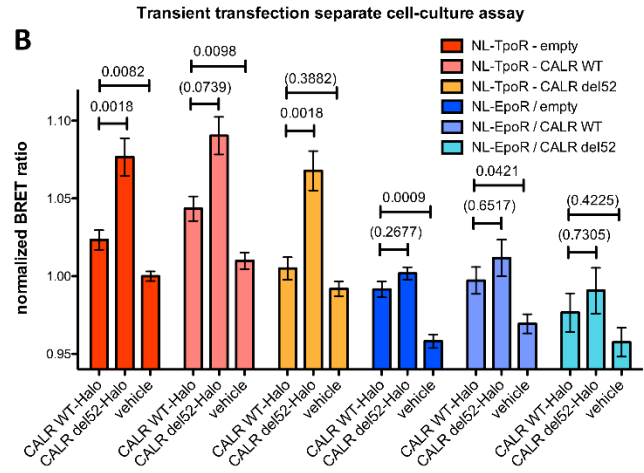
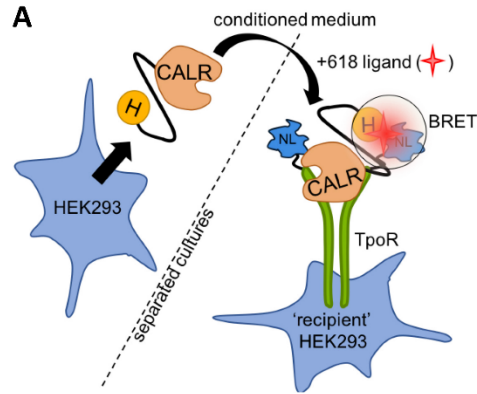


Figure 6

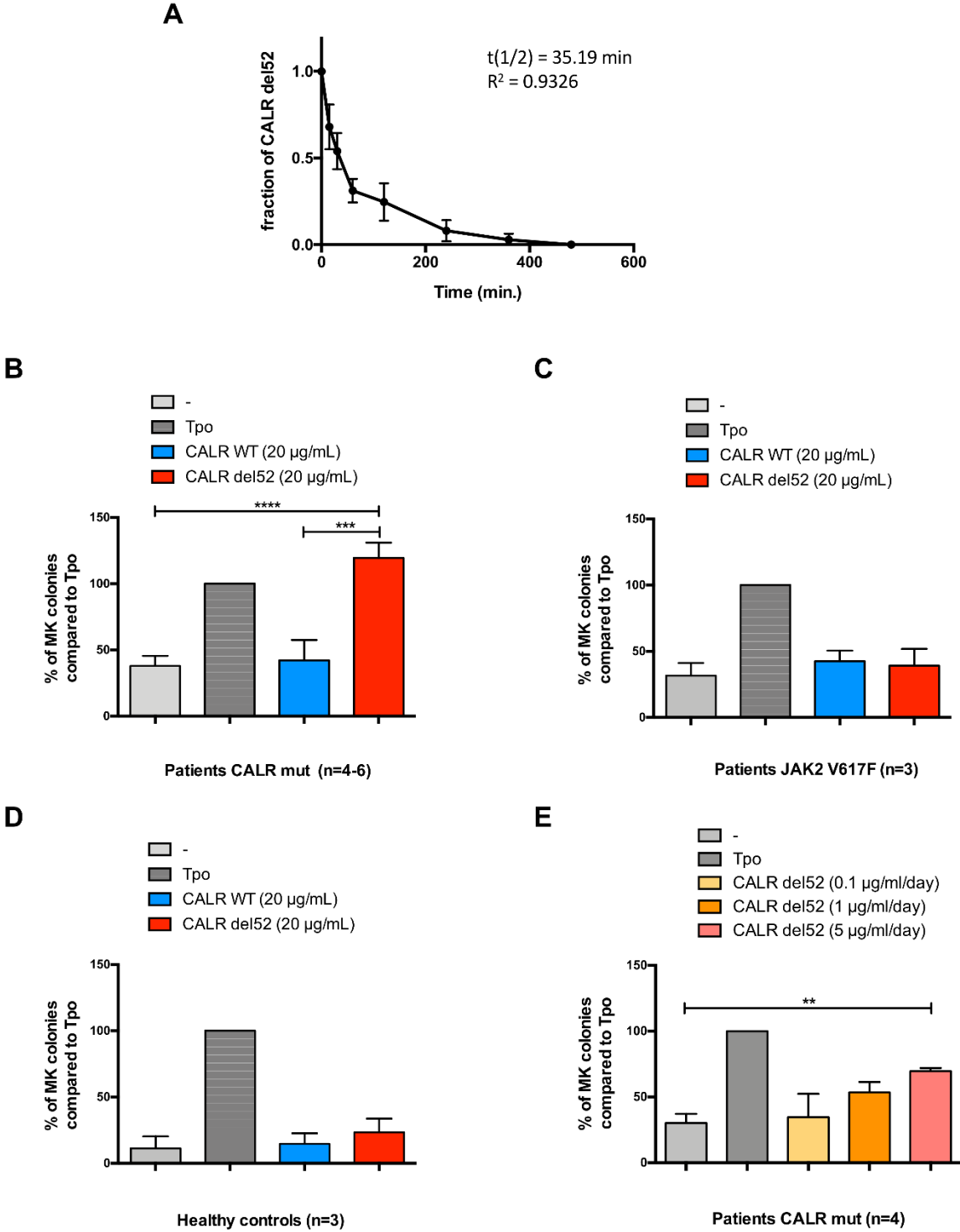
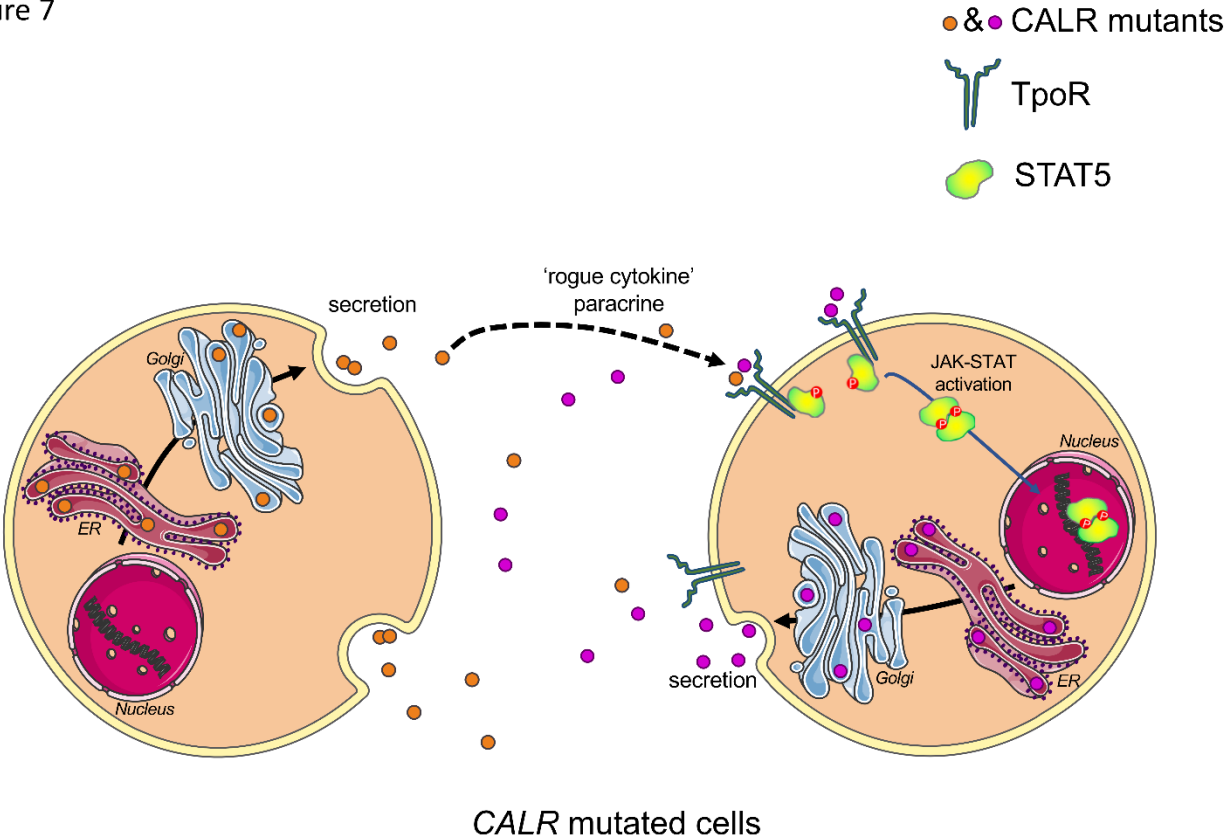


Figure 7



BIBLIOGRAPHIE

- Ali, Haris, Ibrahim Aldoss, Dongyun Yang, Sally Mokhtari, Samer Khaled, Ahmed Aribi, Michelle Afkhami, et al. 2019. « MIPSS701 v2.0 Predicts Long-Term Survival in Myelofibrosis after Allogeneic HCT with the Flu/Mel Conditioning Regimen » 3 (1): 13.
- Aman, Mj, U Keller, G Derigs, M Mohamadzadeh, C Huber, et C Peschel. 1994. « Regulation of Cytokine Expression by Interferon-Alpha in Human Bone Marrow Stromal Cells: Inhibition of Hematopoietic Growth Factors and Induction of Interleukin-1 Receptor Antagonist ». *Blood* 84 (12): 4142-50. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.12.4142.bloodjournal84124142>.
- Anand, Shubha, Frances Stedham, Philip Beer, Emma Gudgin, Christina A. Ortmann, Anthony Bench, Wendy Erber, Anthony R. Green, et Brian J. P. Huntly. 2011. « Effects of the JAK2 Mutation on the Hematopoietic Stem and Progenitor Compartment in Human Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood* 118 (1): 177-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-327593>.
- Araki, Marito, Yinjie Yang, Misa Imai, Yoshihisa Mizukami, Yoshihiko Kihara, Yoshitaka Sunami, Nami Masubuchi, et al. 2019. « Homomultimerization of Mutant Calreticulin Is a Prerequisite for MPL Binding and Activation ». *Leukemia* 33 (1): 122-31. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0181-2>.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert Hasserjian, Jürgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, et James W. Vardiman. 2016. « The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia ». *Blood* 127 (20): 2391-2405. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544>.
- Austin, Rebecca J., Jasmin Straube, Claudia Bruedigam, Gabor Pali, Sebastien Jacquelin, Therese Vu, Joanne Green, et al. 2020. « Distinct Effects of Ruxolitinib and Interferon-Alpha on Murine JAK2V617F Myeloproliferative Neoplasm Hematopoietic Stem Cell Populations ». *Leukemia* 34 (4): 1075-89. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0638-y>.
- Baran-Marszak, F. 2004. « Differential Roles of STAT1 and STAT1 in Fludarabine-Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human B Cells ». *Blood* 104 (8): 2475-83. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3508>.
- Barbui, Tiziano, Ayalew Tefferi, Alessandro M. Vannucchi, Francesco Passamonti, Richard T. Silver, Ronald Hoffman, Srdan Verstovsek, et al. 2018. « Philadelphia Chromosome-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Revised Management Recommendations from European LeukemiaNet ». *Leukemia* 32 (5): 1057-69. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0077-1>.
- Barile, Melania, Katrin Busch, Ann-Kathrin Fanti, Alessandro Greco, Xi Wang, Hideyuki Oguro, Qin Zhang, Sean J. Morrison, Hans-Reimer Rodewald, et Thomas Höfer. 2020. « Hematopoietic Stem Cells Self-Renew Symmetrically or Gradually Proceed to Differentiation ». Preprint. *Systems Biology*. <https://doi.org/10.1101/2020.08.06.239186>.
- Basso-Valentina, Francesca, Gabriel Levy, Leila N. Varghese, Myriam Oufadem, Benedicte Neven, Charlotte Bousard, Nathalie Balayn, et al. 2021. « CALR Mutant Protein

- Rescues the Response of MPL p.R464G Variant Associated with CAMT to Eltrombopag ». *Blood* 138 (6): 480-85. <https://doi.org/10.1182/blood.2020010567>.
- Beer, Philip A., Peter J. Campbell, Linda M. Scott, Anthony J. Bench, Wendy N. Erber, David Bareford, Bridget S. Wilkins, et al. 2008. « MPL Mutations in Myeloproliferative Disorders: Analysis of the PT-1 Cohort ». *Blood* 112 (1): 141-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-131664>.
- Bernardi, Rosa, et Pier Paolo Pandolfi. 2007. « Structure, Dynamics and Functions of Promyelocytic Leukaemia Nuclear Bodies ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (12): 1006-16. <https://doi.org/10.1038/nrm2277>.
- Besancenot, Rodolphe, Ronan Chaligné, Carole Tonetti, Florence Pasquier, Caroline Marty, Yann Lécluse, William Vainchenker, Stefan N. Constantinescu, et Stéphane Giraudier. 2010. « A Senescence-Like Cell-Cycle Arrest Occurs During Megakaryocytic Maturation: Implications for Physiological and Pathological Megakaryocytic Proliferation ». Édité par Adam Goldfarb. *PLoS Biology* 8 (9): e1000476. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000476>.
- Bradley, Tr, et D Metcalf. 1966. « THE GROWTH OF MOUSE BONE MARROW CELLS *IN VITRO* ». *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 44 (3): 287-300. <https://doi.org/10.1038/icb.1966.28>.
- Cabagnols, X, J P Defour, V Ugo, J C Ianotto, P Mossuz, J Mondet, F Girodon, et al. 2015. « Differential Association of Calreticulin Type 1 and Type 2 Mutations with Myelofibrosis and Essential Thrombocytemia: Relevance for Disease Evolution ». *Leukemia* 29 (1): 249-52. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.270>.
- Celik, Hamza, Ethan Krug, Christine R. Zhang, Wentao Han, Nancy Issa, Won Kyun Koh, Hassan Bjeije, et al. 2021. « A Humanized Animal Model Predicts Clonal Evolution and Therapeutic Vulnerabilities in Myeloproliferative Neoplasms ». *Cancer Discovery* 11 (12): 3126-41. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1652>.
- Chachoua, Ilyas, Christian Pecquet, Mira El-Khoury, Harini Nivarthi, Roxana-Irina Albu, Caroline Marty, Vitalina Gryshkova, et al. 2016. « Thrombopoietin Receptor Activation by Myeloproliferative Neoplasm Associated Calreticulin Mutants ». *Blood* 127 (10): 1325-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-681932>.
- Chaligné, Ronan, Chloé James, Carole Tonetti, Rodolphe Besancenot, Jean Pierre Le Couédic, Fanny Fava, Frédéric Mazurier, et al. 2007. « Evidence for MPL W515L/K Mutations in Hematopoietic Stem Cells in Primitive Myelofibrosis ». *Blood* 110 (10): 3735-43. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-089003>.
- Chawla-Sarkar, M, et D J Lindner. s. d. « Apoptosis and Interferons: Role of Interferon-Stimulated Genes as Mediators of Apoptosis », 13.
- Chen, Edwin, Jong Sook Ahn, Charlie E. Massie, David Clynes, Anna L. Godfrey, Juan Li, Hyun Jung Park, et al. 2014. « JAK2V617F Promotes Replication Fork Stalling with Disease-Restricted Impairment of the Intra-S Checkpoint Response ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (42): 15190-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.1401873111>.
- Chen, Edwin, Jong Sook Ahn, David B. Sykes, Lawrence J. Breyfogle, Anna L. Godfrey, Jyoti Nangalia, Amy Ko, Daniel J. DeAngelo, Anthony R. Green, et Ann Mullally. 2015.

- « RECQL5 Suppresses Oncogenic JAK2-Induced Replication Stress and Genomic Instability ». *Cell Reports* 13 (11): 2345-52. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.037>.
- Chen, Edwin, Philip A. Beer, Anna L. Godfrey, Christina A. Ortmann, Juan Li, Ana P. Costa-Pereira, Catherine E. Ingle, Emmanouil T. Dermitzakis, Peter J. Campbell, et Anthony R. Green. 2010. « Distinct Clinical Phenotypes Associated with JAK2V617F Reflect Differential STAT1 Signaling ». *Cancer Cell* 18 (5): 524-35. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.013>.
- Chen, Edwin, Rebekka K. Schneider, Lawrence J. Breyfogle, Emily A. Rosen, Luke Poveromo, Shannon Elf, Amy Ko, et al. 2015. « Distinct Effects of Concomitant Jak2V617F Expression and Tet2 Loss in Mice Promote Disease Progression in Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood* 125 (2): 327-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-567024>.
- Cheon, HyeonJoo, Elise G. Holvey-Bates, John W. Schoggins, Samuel Forster, Paul Hertzog, Naoko Imanaka, Charles M. Rice, Mark W. Jackson, Damian J. Junk, et George R. Stark. 2013. « IFN β -Dependent Increases in STAT1, STAT2, and IRF9 Mediate Resistance to Viruses and DNA Damage ». *The EMBO Journal* 32 (20): 2751-63. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.203>.
- Cheon, HyeonJoo, et George R. Stark. 2009. « Unphosphorylated STAT1 Prolongs the Expression of Interferon-Induced Immune Regulatory Genes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (23): 9373-78. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903487106>.
- Constantinescu, S N, E Croze, A Murti, C Wang, L Basu, D Hollander, D Russell-Harde, M Betts, V Garcia-Martinez, et J E Mullersman. 1995. « Expression and Signaling Specificity of the IFNAR Chain of the Type I Interferon Receptor Complex. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (23): 10487-91. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.23.10487>.
- Cowland, Jack B., et Niels Borregaard. 2016. « Granulopoiesis and Granules of Human Neutrophils ». *Immunological Reviews* 273 (1): 11-28. <https://doi.org/10.1111/imr.12440>.
- Czech, Julia, Sabrina Cordua, Barbora Weinbergerova, Julian Baumeister, Assja Crepcia, Lijuan Han, Tiago Maié, et al. 2019. « JAK2V617F but Not CALR Mutations Confer Increased Molecular Responses to Interferon- α via JAK1/STAT1 Activation ». *Leukemia* 33 (4): 995-1010. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0295-6>.
- Dagher, Tracy, Nabih Maslah, Valérie Edmond, Bruno Cassinat, William Vainchenker, Stéphane Giraudier, Florence Pasquier, et al. 2021. « JAK2V617F Myeloproliferative Neoplasm Eradication by a Novel Interferon/Arsenic Therapy Involves PML ». *The Journal of Experimental Medicine* 218 (2): e20201268. <https://doi.org/10.1084/jem.20201268>.
- Daltro De Oliveira, Rafael, Juliette Soret-Dulphy, Lin-Pierre Zhao, Clemence Marcault, Nicolas Gauthier, Emmanuelle Verger, Nabih Maslah, et al. 2020. « Interferon-Alpha (IFN) Therapy Discontinuation Is Feasible in Myeloproliferative Neoplasm (MPN) Patients with Complete Hematological Remission ». *Blood* 136 (Supplement 1): 35-36. <https://doi.org/10.1182/blood-2020-141223>.

- Dameshek, William. 1951. « Editorial: Some Speculations on the Myeloproliferative Syndromes ». *Blood* 6 (4): 372-75. <https://doi.org/10.1182/blood.V6.4.372.372>.
- Dawson, Mark A., Andrew J. Bannister, Berthold Göttgens, Samuel D. Foster, Till Bartke, Anthony R. Green, et Tony Kouzarides. 2009. « JAK2 Phosphorylates Histone H3Y41 and Excludes HP1 α from Chromatin ». *Nature* 461 (7265): 819-22. <https://doi.org/10.1038/nature08448>.
- Decker, Thomas, Mathias Müller, et Silvia Stockinger. 2005. « The Yin and Yang of Type I Interferon Activity in Bacterial Infection ». *Nature Reviews Immunology* 5 (9): 675-87. <https://doi.org/10.1038/nri1684>.
- Defour, J-P, I Chachoua, C Pecquet, et S N Constantinescu. 2016. « Oncogenic Activation of MPL/Thrombopoietin Receptor by 17 Mutations at W515: Implications for Myeloproliferative Neoplasms ». *Leukemia* 30 (5): 1214-16. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.271>.
- Delhommeau, François, Sabrina Dupont, Carole Tonetti, Aline Massé, Isabelle Godin, Jean-Pierre Le Couedic, Najet Debili, et al. 2007. « Evidence That the JAK2 G1849T (V617F) Mutation Occurs in a Lymphomyeloid Progenitor in Polycythemia Vera and Idiopathic Myelofibrosis ». *Blood* 109 (1): 71-77. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-007146>.
- Delhommeau, François, Véronique Della Valle, Aline Massé, Jean-Pierre Le Couedic, Yann Lécluse, Christophe Marzac, Catherine Lacombe, Philippe Dessen, Michaela Fontenay, et Olivier A Bernard. 2009. « Mutation in TET2 in Myeloid Cancers ». *The New England Journal of Medicine*, 13.
- Dupont, Sabrina, Aline Massé, Chloé James, Irène Teyssandier, Yann Lécluse, Frédéric Larbret, Valérie Ugo, et al. 2007. « The JAK2 617V>F Mutation Triggers Erythropoietin Hypersensitivity and Terminal Erythroid Amplification in Primary Cells from Patients with Polycythemia Vera ». *Blood* 110 (3): 1013-21. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054940>.
- Dykstra, Brad, David Kent, Michelle Bowie, Lindsay McCaffrey, Melisa Hamilton, Kristin Lyons, Shang-Jung Lee, Ryan Brinkman, et Connie Eaves. 2007. « Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs In Vivo ». *Cell Stem Cell* 1 (2): 218-29. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015>.
- Easwar, Arti, et Alexa J. Siddon. 2021. « Genetic Landscape of Myeloproliferative Neoplasms with an Emphasis on Molecular Diagnostic Laboratory Testing ». *Life* 11 (11): 1158. <https://doi.org/10.3390/life11111158>.
- Elf, Shannon, Nouran S. Abdelfattah, Edwin Chen, Javier Perales-Patón, Emily A. Rosen, Amy Ko, Fabian Peisker, et al. 2016. « Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-Terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation ». *Cancer Discovery* 6 (4): 368-81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1434>.
- El-Khoury, Mira, Xénia Cabagnols, Matthieu Mosca, Gaëlle Vertenoël, Christophe Marzac, Fabrizia Favale, Olivier Bluteau, et al. 2020. « Different Impact of Calreticulin Mutations on Human Hematopoiesis in Myeloproliferative Neoplasms ». *Oncogene* 39 (31): 5323-37. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1368-3>.

- Essers, Marieke A. G., Sandra Offner, William E. Blanco-Bose, Zoe Waibler, Ulrich Kalinke, Michel A. Duchosal, et Andreas Trumpp. 2009. « IFN α Activates Dormant Haematopoietic Stem Cells in Vivo ». *Nature* 458 (7240): 904-8. <https://doi.org/10.1038/nature07815>.
- Fabre, Margarete A., José Guilherme de Almeida, Edoardo Fiorillo, Emily Mitchell, Aristi Damaskou, Justyna Rak, Valeria Orrù, et al. 2022. « The Longitudinal Dynamics and Natural History of Clonal Haematopoiesis ». *Nature* 606 (7913): 335-42. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04785-z>.
- Faderl, Stefan, Moshe Talpaz, Zeev Estrov, Susan O'Brien, Razelle Kurzrock, et Hagop M. Kantarjian. 1999. « The Biology of Chronic Myeloid Leukemia ». Édité par Franklin H. Epstein. *New England Journal of Medicine* 341 (3): 164-72. <https://doi.org/10.1056/NEJM199907153410306>.
- Feng, J, B A Witthuhn, T Matsuda, F Kohlhuber, I M Kerr, et J N Ihle. 1997. « Activation of Jak2 Catalytic Activity Requires Phosphorylation of Y1007 in the Kinase Activation Loop ». *Molecular and Cellular Biology* 17 (5): 2497-2501. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2497>.
- Galloway, Jenna L, et Leonard I Zon. 2003. « 3 Ontogeny of Hematopoiesis: Examining the Emergence of Hematopoietic Cells in the Vertebrate Embryo ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 53:139-58. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(03\)53004-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(03)53004-6).
- Garçon, Loïc, Christine Rivat, Chloé James, Catherine Lacout, Valérie Camara-Clayette, Valérie Ugo, Yann Lecluse, Annelise Bennaceur-Griscelli, et William Vainchenker. 2006. « Constitutive Activation of STAT5 and Bcl-XL Overexpression Can Induce Endogenous Erythroid Colony Formation in Human Primary Cells ». *Blood* 108 (5): 1551-54. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-009514>.
- Gaymes, Terry J., Azim Mohamedali, Anthony L. Eiliazadeh, David Darling, et Ghulam J. Mufti. 2017. « FLT3 and JAK2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Promote Interchromosomal Homologous Recombination and the Potential for Copy Neutral Loss of Heterozygosity ». *Cancer Research* 77 (7): 1697-1708. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-1678>.
- Genovese, Giulio, Anna K. Kähler, Robert E. Handsaker, Johan Lindberg, Samuel A. Rose, Samuel F. Bakhoun, Kimberly Chambert, et al. 2014. « Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence ». *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2477-87. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405>.
- Gisslinger, Heinz, Oleh Zagrijtschuk, Veronika Buxhofer-Ausch, Josef Thaler, Ernst Schloegl, Guenther A. Gastl, Dominik Wolf, et al. 2015. « Ropoginterferon Alfa-2b, a Novel IFN α -2b, Induces High Response Rates with Low Toxicity in Patients with Polycythemia Vera ». *Blood* 126 (15): 1762-69. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-04-637280>.
- Godfrey, A. L., E. Chen, C. E. Massie, Y. Silber, F. Pagano, B. Bellosillo, P. Guglielmelli, et al. 2016. « STAT1 Activation in Association with JAK2 Exon 12 Mutations ». *Haematologica* 101 (1): e15-19. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.128546>.
- Godfrey, Anna L., Edwin Chen, Francesca Pagano, Christina A. Ortmann, Yvonne Silber, Beatriz Bellosillo, Paola Guglielmelli, et al. 2012. « JAK2V617F Homozygosity Arises

- Commonly and Recurrently in PV and ET, but PV Is Characterized by Expansion of a Dominant Homozygous Subclone ». *Blood* 120 (13): 2704-7. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-431791>.
- Grinfeld, Jacob, Jyoti Nangalia, E. Joanna Baxter, David C. Wedge, Nicos Angelopoulos, Robert Cantrill, Anna L. Godfrey, et al. 2018. « Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms ». *New England Journal of Medicine* 379 (15): 1416-30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716614>.
- Han, Lijuan, Claudia Schubert, Johanna Köhler, Mirle Schemionek, Susanne Isfort, Tim H. Brümmendorf, Steffen Koschmieder, et Nicolas Chatain. 2016. « Calreticulin-Mutant Proteins Induce Megakaryocytic Signaling to Transform Hematopoietic Cells and Undergo Accelerated Degradation and Golgi-Mediated Secretion ». *Journal of Hematology & Oncology* 9 (1): 45. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0275-0>.
- Harrison, Claire, Jean-Jacques Kiladjian, Haifa Kathrin Al-Ali, Heinz Gisslinger, Roger Waltzman, Viktoriya Stalbovskaya, Mari McQuitty, et al. 2012. « JAK Inhibition with Ruxolitinib versus Best Available Therapy for Myelofibrosis ». *New England Journal of Medicine* 366 (9): 787-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1110556>.
- Hasan, S, B Cassinat, N Droin, J P Le Couedic, F Favale, B Monte-Mor, C Lacout, et al. 2014. « Use of the 46/1 Haplotype to Model JAK2V617F Clonal Architecture in PV Patients: Clonal Evolution and Impact of IFN α Treatment ». *Leukemia* 28 (2): 460-63. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.303>.
- Hasan, Salma, Catherine Lacout, Caroline Marty, Marie Cuingnet, Eric Solary, William Vainchenker, et Jean-Luc Villeval. 2013. « JAK2V617F Expression in Mice Amplifies Early Hematopoietic Cells and Gives Them a Competitive Advantage That Is Hampered by IFN α ». *Blood* 122 (8): 1464-77. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-498956>.
- Hermange, Gurvan, Alicia Rakotonirainy, Mahmoud Bentriou, Amandine Tisserand, Mira El-Khoury, François Girodon, Christophe Marzac, William Vainchenker, Isabelle Plo, et Paul-Henry Cournède. 2022. « Inferring the Initiation and Development of Myeloproliferative Neoplasms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (37): e2120374119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2120374119>.
- . PNAS sous presse. « Inferring the initiation and development of Myeloproliferative Neoplasms ». *PNAS*, PNAS sous presse.
- Hermange, Gurvan, William Vainchenker, Isabelle Plo, et Paul-Henry Cournède. 2021. « Mathematical Modelling, Selection and Hierarchical Inference to Determine the Minimal Dose in IFN α Therapy against Myeloproliferative Neoplasms ». arXiv. <http://arxiv.org/abs/2112.10688>.
- Hong, Qiang, et Buza-Vidas Natalija. 2007. « Critical Role of Thrombopoietin in Maintaining Adult Quiescent Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell*, décembre. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.008>.
- Ito, Kyoko, Raphaël Turcotte, Jinhua Cui, Samuel E. Zimmerman, Sandra Pinho, Toshihide Mizoguchi, Fumio Arai, et al. 2016. « Self-Renewal of a Purified *Tie2*⁺ Hematopoietic Stem Cell Population Relies on Mitochondrial Clearance ». *Science* 354 (6316): 1156-60. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5530>.

- Jacquelin, Sebastien, Jasmin Straube, Leanne Cooper, Therese Vu, Axia Song, Megan Bywater, Eva Baxter, et al. 2018. « Jak2V617F and Dnmt3a Loss Cooperate to Induce Myelofibrosis through Activated Enhancer-Driven Inflammation ». *Blood* 132 (26): 2707-21. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-846220>.
- Jäger, Roland, Heinz Gisslinger, Elisabeth Fuchs, Edith Bogner, Jelena D. Milosevic Feenstra, Jakob Weinzierl, Fiorella Schischlik, et al. 2021. « Germline Genetic Factors Influence the Outcome of Interferon- α Therapy in Polycythemia Vera ». *Blood* 137 (3): 387-91. <https://doi.org/10.1182/blood.2020005792>.
- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes ». *New England Journal of Medicine* 371 (26): 2488-98. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408617>.
- James, Chloe, Frederic Mazurier, Sabrina Dupont, Ronan Chaligne, Isabelle Lamrissi-Garcia, Micheline Tulliez, Eric Lippert, et al. 2008. « The Hematopoietic Stem Cell Compartment of JAK2V617F-Positive Myeloproliferative Disorders Is a Reflection of Disease Heterogeneity ». *Blood* 112 (6): 2429-38. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-02-137877>.
- James, Chloé, Valérie Ugo, Jean-Pierre Le Couédic, Judith Staerk, François Delhommeau, Catherine Lacout, Loïc Garçon, et al. 2005. « A Unique Clonal JAK2 Mutation Leading to Constitutive Signalling Causes Polycythaemia Vera ». *Nature* 434 (7037): 1144-48. <https://doi.org/10.1038/nature03546>.
- Johansson, Peter. 2006. « Epidemiology of the Myeloproliferative Disorders Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia ». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 32 (3): 171-73. <https://doi.org/10.1055/s-2006-939430>.
- Kameda, Takuro, Kotaro Shide, Takumi Yamaji, Ayako Kamiunten, Masaaki Sekine, Yasuhiro Taniguchi, Tomonori Hidaka, et al. 2015. « Loss of TET2 Has Dual Roles in Murine Myeloproliferative Neoplasms: Disease Sustainer and Disease Accelerator ». *Blood* 125 (2): 304-15. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-555508>.
- Khoury, Joseph D., Eric Solary, Oussama Abla, Yasmine Akkari, Rita Alaggio, Jane F. Apperley, Rafael Bejar, et al. 2022. « The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms ». *Leukemia* 36 (7): 1703-19. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1>.
- Kiladjian, Jean-Jacques, Bruno Cassinat, Sylvie Chevret, Pascal Turlure, Nathalie Cambier, Murielle Roussel, Sylvia Bellucci, Bernard Grandchamp, Christine Chomienne, et Pierre Fenaux. 2008. « Pegylated Interferon- α -2a Induces Complete Hematologic and Molecular Responses with Low Toxicity in Polycythemia Vera ». *Blood* 112 (8): 3065-72. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143537>.
- Kiladjian, Jean-Jacques, Christoph Klade, Pencho Georgiev, Dorota Krochmalczyk, Liana Gercheva-Kyuchukova, Miklos Egyed, Petr Dulicek, et al. 2022. « Long-Term Outcomes of Polycythemia Vera Patients Treated with Ropeginterferon Alfa-2b ». *Leukemia* 36 (5): 1408-11. <https://doi.org/10.1038/s41375-022-01528-x>.
- Kjær, Lasse, Sabrina Cordua, Morten O. Holmström, Mads Thomassen, Torben A Kruse, Niels Pallisgaard, Thomas S. Larsen, Karin de Stricker, Vibe Skov, et Hans C. Hasselbalch.

2016. « Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment ». Édité par Ken Mills. *PLOS ONE* 11 (10): e0165336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165336>.
- Klampfl, Thorsten, Heinz Gisslinger, Ashot S. Harutyunyan, Harini Nivarthi, Elisa Rumi, Jelena D. Milosevic, Nicole C.C. Them, et al. 2013. « Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms ». *New England Journal of Medicine* 369 (25): 2379-90. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311347>.
- Knudsen, Trine Alma, Vibe Skov, Kristen Stevenson, Lillian Werner, William Duke, Charles Laureore, Christopher J. Gibson, et al. 2022. « Genomic Profiling of a Randomized Trial of Interferon- α vs Hydroxyurea in MPN Reveals Mutation-Specific Responses ». *Blood Advances* 6 (7): 2107-19. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004856>.
- Kralovics, Robert, Francesco Passamonti, Andreas S. Buser, Soon-Siong Teo, Ralph Tiedt, Jakob R. Passweg, Andre Tichelli, Mario Cazzola, et Radek C. Skoda. 2005. « A Gain-of-Function Mutation of *JAK2* in Myeloproliferative Disorders ». *New England Journal of Medicine* 352 (17): 1779-90. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051113>.
- Kröger, Nicolaus, Toni Giorgino, Bart L. Scott, Markus Ditschkowski, Haefaa Alchalby, Francisco Cervantes, Alessandro Vannucchi, et al. 2015. « Impact of Allogeneic Stem Cell Transplantation on Survival of Patients Less than 65 Years of Age with Primary Myelofibrosis ». *Blood* 125 (21): 3347-50. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-10-608315>.
- Lacout, Catherine, Didier F. Pisani, Micheline Tulliez, Françoise Moreau Gachelin, William Vainchenker, et Jean-Luc Villeval. 2006. « *JAK2V617F* Expression in Murine Hematopoietic Cells Leads to MPD Mimicking Human PV with Secondary Myelofibrosis ». *Blood* 108 (5): 1652-60. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002030>.
- Laurenti, Elisa, et Berthold Göttgens. 2018. « From Haematopoietic Stem Cells to Complex Differentiation Landscapes ». *Nature* 553 (7689): 418-26. <https://doi.org/10.1038/nature25022>.
- Lee-Six, Henry, Nina Friesgaard Øbro, Mairi S. Shepherd, Sebastian Grossmann, Kevin Dawson, Miriam Belmonte, Robert J. Osborne, et al. 2018. « Population Dynamics of Normal Human Blood Inferred from Somatic Mutations ». *Nature* 561 (7724): 473-78. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0>.
- Li, Bing, Wenbin An, Hua Wang, Timour Baslan, Shoron Mowla, Aishwarya Krishnan, Wenbin Xiao, et al. 2022. « BMP2/SMAD Pathway Activation in *JAK2/P53*-Mutant Megakaryocyte/Erythroid Progenitors Promotes Leukemic Transformation ». *Blood* 139 (25): 3630-46. <https://doi.org/10.1182/blood.2021014465>.
- Lindauer, Klaus, Thomas Loerting, Klaus R. Liedl, et Romano T. Kroemer. 2001. « Prediction of the Structure of Human Janus Kinase 2 (*JAK2*) Comprising the Two Carboxy-Terminal Domains Reveals a Mechanism for Autoregulation ». *Protein Engineering, Design and Selection* 14 (1): 27-37. <https://doi.org/10.1093/protein/14.1.27>.
- Lindenmann, J., D. C. Burke, et A. Isaacs. 1957. « Studies on the Production, Mode of Action and Properties of Interferon ». *British Journal of Experimental Pathology* 38 (5): 551-62.

- Liu, Peng, Liwei Zhao, Friedemann Loos, Caroline Marty, Wei Xie, Isabelle Martins, Sylvie Lachkar, et al. 2020. « Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells ». *Molecular Cell* 77 (4): 748-760.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.004>.
- Lu, Min, Xiaoli Wang, Yan Li, Joseph Tripodi, Goar Mosoyan, John Mascarenhas, Marina Kremyanskaya, Vesna Najfeld, et Ronald Hoffman. 2012. « Combination Treatment in Vitro with Nutlin, a Small-Molecule Antagonist of MDM2, and Pegylated Interferon- α 2a Specifically Targets JAK2V617F-Positive Polycythemia Vera Cells » 120 (15): 8.
- Lu, Min, Wei Zhang, Yan Li, Dmitriy Berenzon, Xiaoli Wang, Jiapeng Wang, John Mascarenhas, Mingjiang Xu, et Ronald Hoffman. 2010. « Interferon- α Targets JAK2V617F-Positive Hematopoietic Progenitor Cells and Acts through the P38 MAPK Pathway ». *Experimental Hematology* 38 (6): 472-80. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2010.03.005>.
- Lundberg, Pontus, Axel Karow, Ronny Nienhold, Renate Looser, Hui Hao-Shen, Ina Nissen, Sabine Girsberger, et al. 2014. « Clonal Evolution and Clinical Correlates of Somatic Mutations in Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood* 123 (14): 2220-28. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-537167>.
- Majeti, Ravindra, Christopher Y. Park, et Irving L. Weissman. 2007. « Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood ». *Cell Stem Cell* 1 (6): 635-45. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.001>.
- Marchioli, Roberto, Guido Finazzi, Giorgina Specchia, Rossella Cacciola, Riccardo Cavazzina, Daniela Cilloni, Valerio De Stefano, et al. 2013. « Cardiovascular Events and Intensity of Treatment in Polycythemia Vera ». *New England Journal of Medicine* 368 (1): 22-33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1208500>.
- Marty, C, C Lacout, N Droin, J-P Le Couédic, V Ribrag, E Solary, W Vainchenker, J-L Villeval, et I Plo. 2013. « A Role for Reactive Oxygen Species in JAK2V617F Myeloproliferative Neoplasm Progression ». *Leukemia* 27 (11): 2187-95. <https://doi.org/10.1038/leu.2013.102>.
- Marty, Caroline, Christian Pecquet, Harini Nivarthi, Mira El-Khoury, Ilyas Chachoua, Micheline Tulliez, Jean-Luc Villeval, et al. 2016. « Calreticulin Mutants in Mice Induce an MPL-Dependent Thrombocytosis with Frequent Progression to Myelofibrosis ». *Blood* 127 (10): 1317-24. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679571>.
- Mascarenhas, John, Min Lu, Heidi Kosiorek, Elizabeth Virtgaym, Lijuan Xia, Lonette Sandy, Ruben Mesa, et al. 2019. « Oral Idasanutlin in Patients with Polycythemia Vera ». *Blood* 134 (6): 525-33. <https://doi.org/10.1182/blood.2018893545>.
- Maslah, Nabih, Emmanuelle Verger, Stéphane Giraudier, Mathias Chea, Ronald Hoffman, John Mascarenhas, Bruno Cassinat, et Jean-Jacques Kiladjian. 2022. « Single-Cell Analysis Reveals Selection of TP53 -Mutated Clones after MDM2 Inhibition ». *Blood Advances* 6 (9): 2813-23. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005867>.
- Michalak, Marek, Jody Groenendyk, Eva Szabo, Leslie I. Gold, et Michal Opas. 2009. « Calreticulin, a Multi-Process Calcium-Buffering Chaperone of the Endoplasmic Reticulum ». *Biochemical Journal* 417 (3): 651-66. <https://doi.org/10.1042/BJ20081847>.

- Michalska, Agata, Katarzyna Blaszczyk, Joanna Wesoly, et Hans A. R. Bluysen. 2018. « A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses ». *Frontiers in Immunology* 9 (mai): 1135. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01135>.
- Mitchell, Emily, Michael Spencer Chapman, Nicholas Williams, Kevin J. Dawson, Nicole Mende, Emily F. Calderbank, Hyunchul Jung, et al. 2022. « Clonal Dynamics of Haematopoiesis across the Human Lifespan ». *Nature* 606 (7913): 343-50. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04786-y>.
- Moremen, Kelley W., Michael Tiemeyer, et Alison V. Nairn. 2012. « Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (7): 448-62. <https://doi.org/10.1038/nrm3383>.
- Morrison, Sean J., et Judith Kimble. 2006. « Asymmetric and Symmetric Stem-Cell Divisions in Development and Cancer ». *Nature* 441 (7097): 1068-74. <https://doi.org/10.1038/nature04956>.
- Mosca, Matthieu, Gurvan Hermange, Amandine Tisserand, Robert Noble, Christophe Marzac, Caroline Marty, Cécile Le Sueur, et al. 2021. « Inferring the Dynamics of Mutated Hematopoietic Stem and Progenitor Cells Induced by IFN α in Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood* 138 (22): 2231-43. <https://doi.org/10.1182/blood.2021010986>.
- Mullally, Ann, Claudia Bruedigam, Luke Poveromo, Florian H Heidel, Amy Purdon, Therese Vu, Rebecca Austin, et al. 2013. « Depletion of Jak2V617F Myeloproliferative Neoplasm-Propagating Stem Cells by Interferon- α in a Murine Model of Polycythemia Vera » 121 (18): 11.
- Müller, Ulrike, Ulrich Steinhoff, Luiz F. L. Reis, Silvio Hemmi, Jovan Pavlovic, Rolf M. Zinkernagel, et Michel Aguet. 1994. « Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense ». *Science* 264 (5167): 1918-21. <https://doi.org/10.1126/science.8009221>.
- Murakami, Shohei, Vilma Barroca, Leïla Perié, Anne Bravard, Jacqueline Bernardino-Sgherri, Amandine Tisserand, Caroline Devanand, et al. 2022. « *In Vivo* Monitoring of Polycythemia Vera Development Reveals Carbonic Anhydrase 1 as a Potent Therapeutic Target ». *Blood Cancer Discovery* 3 (4): 285-97. <https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-21-0039>.
- Nakamura-Ishizu, Ayako, Hitoshi Takizawa, et Toshio Suda. 2014. « The Analysis, Roles and Regulation of Quiescence in Hematopoietic Stem Cells ». *Development* 141 (24): 4656-66. <https://doi.org/10.1242/dev.106575>.
- Nakatake, M, B Monte-Mor, N Debili, N Casadevall, V Ribrag, E Solary, W Vainchenker, et I Plo. 2012. « JAK2V617F Negatively Regulates P53 Stabilization by Enhancing MDM2 via La Expression in Myeloproliferative Neoplasms ». *Oncogene* 31 (10): 1323-33. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.313>.
- Nam, Anna S., Kyu-Tae Kim, Ronan Chaligne, Franco Izzo, Chelston Ang, Justin Taylor, Robert M. Myers, et al. 2019. « Somatic Mutations and Cell Identity Linked by Genotyping of Transcriptomes ». *Nature* 571 (7765): 355-60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1367-0>.

- Nangalia, J., C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, et al. 2013. « Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2* ». *New England Journal of Medicine* 369 (25): 2391-2405. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312542>.
- Nangalia, J., F. L. Nice, D. C. Wedge, A. L. Godfrey, J. Grinfeld, C. Thakker, C. E. Massie, et al. 2015. « DNMT3A Mutations Occur Early or Late in Patients with Myeloproliferative Neoplasms and Mutation Order Influences Phenotype ». *Haematologica* 100 (11): e438-42. <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.129510>.
- Nivarthi, H, D Chen, C Cleary, B Kubsova, R Jäger, E Bogner, C Marty, et al. 2016. « Thrombopoietin Receptor Is Required for the Oncogenic Function of *CALR* Mutants ». *Leukemia* 30 (8): 1759-63. <https://doi.org/10.1038/leu.2016.32>.
- Notta, Faiyaz, Sasan Zandi, Naoya Takayama, Stephanie Dobson, Olga I. Gan, Gavin Wilson, Kerstin B. Kaufmann, et al. 2016. « Distinct Routes of Lineage Development Reshape the Human Blood Hierarchy across Ontogeny ». *Science* 351 (6269): aab2116. <https://doi.org/10.1126/science.aab2116>.
- Ortmann, Christina A., David G. Kent, Jyoti Nangalia, Yvonne Silber, David C. Wedge, Jacob Grinfeld, E. Joanna Baxter, et al. 2015. « Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms ». *New England Journal of Medicine* 372 (7): 601-12. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412098>.
- Pardanani, Animesh D., Ross L. Levine, Terra Lasho, Yana Pikman, Ruben A. Mesa, Martha Wadleigh, David P. Steensma, et al. 2006. « MPL515 Mutations in Myeloproliferative and Other Myeloid Disorders: A Study of 1182 Patients ». *Blood* 108 (10): 3472-76. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-018879>.
- Pecquet, Christian, Ilyas Chachoua, Anita Roy, Thomas Balligand, Gaëlle Vertenoil, Emilie Leroy, Roxana-Irina Albu, et al. 2019. « Calreticulin Mutants as Oncogenic Rogue Chaperones for TpoR and Traffic-Defective Pathogenic TpoR Mutants ». *Blood* 133 (25): 2669-81. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874578>.
- Pietras, Eric M., Ranjani Lakshminarasimhan, Jose-Marc Techner, Sarah Fong, Johanna Flach, Mikhail Binnewies, et Emmanuelle Passegué. 2014. « Re-Entry into Quiescence Protects Hematopoietic Stem Cells from the Killing Effect of Chronic Exposure to Type I Interferons ». *Journal of Experimental Medicine* 211 (2): 245-62. <https://doi.org/10.1084/jem.20131043>.
- Pikman, Yana, Benjamin H Lee, Thomas Mercher, Elizabeth McDowell, Benjamin L Ebert, Maricel Gozo, Adam Cuker, et al. 2006. « MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia ». Édité par Charles Sawyers. *PLoS Medicine* 3 (7): e270. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030270>.
- Plo, Isabelle, Christine Bellanné-Chantelot, Matthieu Mosca, Stefania Mazzi, Caroline Marty, et William Vainchenker. 2017. « Genetic Alterations of the Thrombopoietin/MPL/JAK2 Axis Impacting Megakaryopoiesis ». *Frontiers in Endocrinology* 8 (septembre): 234. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00234>.
- Plo, Isabelle, Mayuka Nakatake, Laurent Malivert, Jean-Pierre de Villartay, Stéphane Giraudier, Jean-Luc Villeval, Lisa Wiesmuller, et William Vainchenker. 2008. « JAK2 Stimulates Homologous Recombination and Genetic Instability: Potential Implication

- in the Heterogeneity of Myeloproliferative Disorders ». *Blood* 112 (4): 1402-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134114>.
- Porta, Chiara, Reda Hadj-Slimane, Mohamed Nejmeddine, Mathieu Pampin, Michael G Tovey, Lucile Espert, Sandra Alvarez, et Mounira K Chelbi-Alix. 2005. « Interferons α and γ Induce P53-Dependent and P53-Independent Apoptosis, Respectively ». *Oncogene* 24 (4): 605-15. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208204>.
- Quintás-Cardama, Alfonso, Omar Abdel-Wahab, Taghi Manshouri, Outi Kilpivaara, Jorge Cortes, Anne-Laure Roupie, Su-Jiang Zhang, et al. 2013. « Molecular Analysis of Patients with Polycythemia Vera or Essential Thrombocythemia Receiving Pegylated Interferon α -2a ». *Blood* 122 (6): 893-901. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-442012>.
- Raffaele, Landolfi, Marchioli Roberto, Kutti Jack, Gisslinger Heinz, Tognoni Gianni, Patrono Carlo, et Barbui Tiziano. 2004. « Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera ». *The New England Journal of Medicine*, 11.
- Rampal, Raajit, Jihae Ahn, Omar Abdel-Wahab, Michelle Nahas, Kai Wang, Doron Lipson, Geoff A. Otto, et al. 2014. « Genomic and Functional Analysis of Leukemic Transformation of Myeloproliferative Neoplasms ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (50). <https://doi.org/10.1073/pnas.1407792111>.
- Rao, Tata Nageswara, Nils Hansen, Jan Stetka, Damien Luque Paz, Milena Kalmer, Julian Hil, Lucia Kubovcakova, et al. 2021. « JAK2-V617F and Interferon- α Induce Megakaryocyte-Biased Stem Cells Characterized by Decreased Long-Term Functionality », 13.
- Rodriguez-Fraticelli, Alejo E., Samuel L. Wolock, Caleb S. Weinreb, Riccardo Panero, Sachin H. Patel, Maja Jankovic, Jianlong Sun, Raffaele A. Calogero, Allon M. Klein, et Fernando D. Camargo. 2018. « Clonal Analysis of Lineage Fate in Native Haematopoiesis ». *Nature* 553 (7687): 212-16. <https://doi.org/10.1038/nature25168>.
- Rodriguez-Meira, Alba, Ruggiero Norfo, Wei Xiong Wen, Agathe L. Chédeville, Haseeb Rahman, Jennifer O'Sullivan, Guanlin Wang, et al. 2022. « Deciphering *TP53* Mutant Cancer Evolution with Single-Cell Multi-Omics ». Preprint. *Cancer Biology*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.28.485984>.
- Sahin, Umut, Omar Ferhi, Xavier Carnec, Alessia Zamborlini, Laurent Peres, Florence Jollivet, Adeline Vitaliano-Prunier, Hugues de Thé, et Valérie Lallemand-Breitenbach. 2014. « Interferon Controls SUMO Availability via the Lin28 and Let-7 Axis to Impede Virus Replication ». *Nature Communications* 5 (1): 4187. <https://doi.org/10.1038/ncomms5187>.
- Sahin, Umut, Valérie Lallemand-Breitenbach, et Hugues de Thé. 2014. « PML Nuclear Bodies: Regulation, Function and Therapeutic Perspectives: PML Nuclear Bodies ». *The Journal of Pathology* 234 (3): 289-91. <https://doi.org/10.1002/path.4426>.
- Saleiro, Diana, Jeremy Q. Wen, Ewa M. Kosciuczuk, Frank Eckerdt, Elspeth M. Beauchamp, Chidera V. Oku, Gavin T. Blyth, et al. 2022. « Discovery of a Signaling Feedback Circuit That Defines Interferon Responses in Myeloproliferative Neoplasms ». *Nature Communications* 13 (1): 1750. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29381-7>.

- Sanjuan-Pla, Alejandra, Iain C. Macaulay, Christina T. Jensen, Petter S. Woll, Tiago C. Luis, Adam Mead, Susan Moore, et al. 2013. « Platelet-Biased Stem Cells Reside at the Apex of the Haematopoietic Stem-Cell Hierarchy ». *Nature* 502 (7470): 232-36. <https://doi.org/10.1038/nature12495>.
- Sato, Taku, Nobuyuki Onai, Hiroki Yoshihara, Fumio Arai, Toshio Suda, et Toshiaki Ohteki. 2009. « Interferon Regulatory Factor-2 Protects Quiescent Hematopoietic Stem Cells from Type I Interferon-Dependent Exhaustion ». *Nature Medicine* 15 (6): 696-700. <https://doi.org/10.1038/nm.1973>.
- Scott, Linda M., Mike A. Scott, Peter J. Campbell, et Anthony R. Green. 2006. « Progenitors Homozygous for the V617F Mutation Occur in Most Patients with Polycythemia Vera, but Not Essential Thrombocythemia ». *Blood* 108 (7): 2435-37. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-018259>.
- Scott, Linda M, Mike A Scott, Michael R Stratton, Wendy N Erber, Claire N Harrison, D Gary Gilliland, Anthony R Green, et F R C Path. 2007. « JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis ». *The New England Journal of Medicine*, 10.
- Silver, Richard T. 1988. « RECOMBINANT INTERFERON-ALPHA FOR TREATMENT OF POLYCYTHAEMIA VERA ». *The Lancet* 332 (8607): 403. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)92881-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)92881-4).
- Sung, Pil Soo, HyeonJoo Cheon, Chung Hwan Cho, Seon-Hui Hong, Do Youn Park, Hyung-Il Seo, Su-Hyung Park, Seung Kew Yoon, George R. Stark, et Eui-Cheol Shin. 2015. « Roles of Unphosphorylated ISGF3 in HCV Infection and Interferon Responsiveness ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (33): 10443-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513341112>.
- Tak, Tamar, Giulio Prevedello, Gaël Simon, Noémie Paillon, Camélia Benlabiod, Caroline Marty, Isabelle Plo, Ken R Duffy, et Leïla Perié. 2021. « HSPCs Display Within-Family Homogeneity in Differentiation and Proliferation despite Population Heterogeneity ». *ELife* 10 (mai): e60624. <https://doi.org/10.7554/eLife.60624>.
- Tefferi, Ayalew. 2021. « Primary Myelofibrosis: 2021 Update on Diagnosis, Risk-stratification and Management ». *American Journal of Hematology* 96 (1): 145-62. <https://doi.org/10.1002/ajh.26050>.
- Tefferi, Ayalew, et Tiziano Barbui. 2020. « Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia: 2021 Update on Diagnosis, Risk-stratification and Management ». *American Journal of Hematology* 95 (12): 1599-1613. <https://doi.org/10.1002/ajh.26008>.
- Tefferi, Ayalew, Terra L. Lasho, Christy M. Finke, Yoseph Elala, Curtis A. Hanson, Rhett P. Ketterling, Naseema Gangat, et Animesh Pardanani. 2016. « Targeted Deep Sequencing in Primary Myelofibrosis ». *Blood Advances* 1 (2): 105-11. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000208>.
- Tefferi, Ayalew, Terra L. Lasho, Paola Guglielmelli, Christy M. Finke, Giada Rotunno, Yoseph Elala, Annalisa Pacilli, et al. 2016. « Targeted Deep Sequencing in Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia ». *Blood Advances* 1 (1): 21-30. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2016000216>.

- Tefferi, Ayalew, Maura Nicolosi, Mythri Mudireddy, Terra L. Lasho, Naseema Gangat, Kebede H. Begna, Curtis A. Hanson, Rhett P. Ketterling, et Animesh Pardanani. 2018. « Revised Cytogenetic Risk Stratification in Primary Myelofibrosis: Analysis Based on 1002 Informative Patients ». *Leukemia* 32 (5): 1189-99. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0018-z>.
- Tefferi, Ayalew, et Animesh Pardanani. 2015. « Myeloproliferative Neoplasms ». *Myeloproliferative Neoplasms*, 9.
- Tiedt, Ralph, Hui Hao-Shen, Marta A Sobas, Renate Looser, et Stephan Dirnhofer. 2008. « Ratio of Mutant JAK2-V617F to Wild-Type Jak2 Determines the MPD Phenotypes in Transgenic Mice » 111 (8): 10.
- Till, J E, et E A McCULLOCH. 1950. « A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells », 10.
- Tong, Jingyuan, Ting Sun, Shihui Ma, Yanhong Zhao, Mankai Ju, Yuchen Gao, Ping Zhu, et al. 2021. « Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity Is Linked to the Initiation and Therapeutic Response of Myeloproliferative Neoplasms ». *Cell Stem Cell* 28 (3): 502-513.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.01.018>.
- Tsuruta-Kishino, T, J Koya, K Kataoka, K Narukawa, Y Sumitomo, H Kobayashi, T Sato, et M Kurokawa. 2017. « Loss of P53 Induces Leukemic Transformation in a Murine Model of Jak2 V617F-Driven Polycythemia Vera ». *Oncogene* 36 (23): 3300-3311. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.478>.
- Vainchenker, William, et Robert Kralovics. 2017. « Genetic Basis and Molecular Pathophysiology of Classical Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood* 129 (6): 667-79. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940>.
- Van Egeren, Debra, Javier Escabi, Maximilian Nguyen, Shichen Liu, Christopher R. Reilly, Sachin Patel, Baransel Kamaz, et al. 2021. « Reconstructing the Lineage Histories and Differentiation Trajectories of Individual Cancer Cells in Myeloproliferative Neoplasms ». *Cell Stem Cell* 28 (3): 514-523.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.02.001>.
- Vannucchi, Alessandro M., Jean Jacques Kiladjian, Martin Griesshammer, Tamas Masszi, Simon Durrant, Francesco Passamonti, Claire N. Harrison, et al. 2015. « Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera ». *New England Journal of Medicine* 372 (5): 426-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409002>.
- Vanuytsel, Kim, Martin H. Steinberg, et George J. Murphy. 2019. « Recapitulating Hematopoietic Development in a Dish ». In *Medical Applications of IPS Cells*, édité par Haruhisa Inoue et Yukio Nakamura, 45-71. Current Human Cell Research and Applications. Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3672-0_4.
- Verger, Emmanuelle, et Bruno Cassinat. 2015. « Clinical and Molecular Response to Interferon- α Therapy in Essential Thrombocythemia Patients with CALR Mutations » 126 (24): 7.
- Walter, Dagmar, Amelie Lier, Anja Geiselhart, Frederic B. Thalheimer, Sina Huntscha, Mirko C. Sobotta, Bettina Moehrle, et al. 2015. « Exit from Dormancy Provokes DNA-

- Damage-Induced Attrition in Haematopoietic Stem Cells ». *Nature* 520 (7548): 549-52. <https://doi.org/10.1038/nature14131>.
- Walz, Christoph, Wesam Ahmed, Katherine Lazarides, Monica Betancur, Nihal Patel, Lothar Hennighausen, Virginia M. Zaleskas, et Richard A. Van Etten. 2012. « Essential Role for Stat5a/b in Myeloproliferative Neoplasms Induced by BCR-ABL1 and JAK2V617F in Mice ». *Blood* 119 (15): 3550-60. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397554>.
- Walz, Christoph, Brian J. Crowley, Heidi E. Hudon, Jessica L. Gramlich, Donna S. Neuberg, Klaus Podar, James D. Griffin, et Martin Sattler. 2006. « Activated Jak2 with the V617F Point Mutation Promotes G1/S Phase Transition ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (26): 18177-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600064200>.
- Wang, L, S I Swierczek, L Lanikova, S J Kim, K Hickman, K Walker, K Wang, et al. 2014. « The Relationship of JAK2V617F and Acquired UPD at Chromosome 9p in Polycythemia Vera ». *Leukemia* 28 (4): 938-41. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.20>.
- Wang, Qin, Yoshitaka Miyakawa, Norma Fox, et Kenneth Kaushansky. 2000. « Interferon- α Directly Represses Megakaryopoiesis by Inhibiting Thrombopoietin-Induced Signaling through Induction of SOCS-1 ». *Blood* 96 (6): 2093-99. <https://doi.org/10.1182/blood.V96.6.2093>.
- Wang, Wenshi, Yuebang Yin, Lei Xu, Junhong Su, Fen Huang, Yijin Wang, Patrick P. C. Boor, et al. 2017. « Unphosphorylated ISGF3 Drives Constitutive Expression of Interferon-Stimulated Genes to Protect against Viral Infections ». *Science Signaling* 10 (476): eaah4248. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aah4248>.
- Watson, Caroline J., A. L. Papula, Gladys Y. P. Poon, Wing H. Wong, Andrew L. Young, Todd E. Druley, Daniel S. Fisher, et Jamie R. Blundell. 2020. « The Evolutionary Dynamics and Fitness Landscape of Clonal Hematopoiesis ». *Science* 367 (6485): 1449-54. <https://doi.org/10.1126/science.aay9333>.
- Williams, David B. 2006. « Beyond Lectins: The Calnexin/Calreticulin Chaperone System of the Endoplasmic Reticulum ». *Journal of Cell Science* 119 (4): 615-23. <https://doi.org/10.1242/jcs.02856>.
- Williams, Nicholas, Joe Lee, Emily Mitchell, Luiza Moore, E. Joanna Baxter, James Hewinson, Kevin J. Dawson, et al. 2022. « Life Histories of Myeloproliferative Neoplasms Inferred from Phylogenies ». *Nature* 602 (7895): 162-68. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04312-6>.
- Yacoub, Abdulraheem, John Mascarenhas, Heidi Kosiorek, Josef T. Prchal, Dmitry Berenzon, Maria R. Baer, Ellen Ritchie, et al. 2019. « Pegylated Interferon Alfa-2a for Polycythemia Vera or Essential Thrombocythemia Resistant or Intolerant to Hydroxyurea ». *Blood* 134 (18): 1498-1509. <https://doi.org/10.1182/blood.2019000428>.
- Yamaoka, Kunihiro, Pipsa Saharinen, Marko Pesu, Vance ET Holt, Olli Silvennoinen, et John J O'Shea. 2004. « The Janus Kinases (Jaks) ». *Genome Biology* 5 (12): 253. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-12-253>.
- Yan, Dongqing, Robert E. Hutchison, et Golam Mohi. 2012. « Critical Requirement for Stat5 in a Mouse Model of Polycythemia Vera ». *Blood* 119 (15): 3539-49. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-345215>.

- Yin, Fenglei, Juan Yin, Weixing Xu, Shuchen Li, Wei Zhang, et Juan Wang. 2022. « Analysis of the Clinical Significance and Safety of Interferon in the Treatment of Chronic Myeloproliferative Tumors ». Édité par Xueliang Wu. *Journal of Oncology* 2022 (mai): 1-5. <https://doi.org/10.1155/2022/6551868>.
- Zhao, Rui, George A. Follows, Philip A. Beer, Linda M. Scott, Brian J.P. Huntly, Anthony R. Green, et Denis R. Alexander. 2008. « Inhibition of the Bcl-x_L Deamidation Pathway in Myeloproliferative Disorders ». *New England Journal of Medicine* 359 (26): 2778-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804953>.