Université de Paris

INSTITUT DE RECHERCHE SAINT-LOUIS
Hématologie I Immunologie I Oncologie

ECOLE DOCTORALE
Hématologie - Oncogenèse - Biothérapies

THESE DE DOCTORAT de l'UNIVERSITE DE PARIS

ED n°561

Hématologie, Oncogénèse, Biothérapies

Spécialité : Hématologie

Directeurs de thèse :

Dr Bruno CASSINAT
PH, HDR, Université de Paris

Pr Jean-Jacques KILADJIAN
PU-PH, Université de Paris

Réalisée dans
l'Unité **INSERM U1131**

Effets et mécanismes d'actions de l'interféron alpha associé au trioxyde d'arsenic dans les Néoplasies Myéloprolifératives mutées JAK2V617F

Soutenue le 24/11/2020

Par **Nabih MASLAH**

Composition du Jury

Dr Eric GILSON PU-PH, Université de Nice	**Président**
Pr Valérie UGO PU-PH, Université d'Angers	**Rapporteur**
Pr Loïc GARCON PU-PH, Université d'Amiens	**Rapporteur**
Pr Hugues DE THE PU-PH, Université de Paris	**Examinateur**
Dr Wassim EL NEMER CR, HDR, Université d'Aix-Marseille	**Examinateur**

LISTE DES ABREVIATIONS 4

TABLE DES ILLUSTRATIONS 9

PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION 11

I HEMATOPOÏESE HUMAINE 11
1. Définition 11
2. Les cellules souches hématopoïétiques 12
2.1 Définition 12
2.2 Isolement 13
3. Différenciation hématopoïétique 14
3.1 Progéniteurs hématopoïétiques 14
3.1.1 Selon le modèle classique 14
3.1.2 Selon le modèle revisité 16
3.2 Différenciation terminale 17
3.2.1 Différentiation mégacaryocytaire 18
3.2.1.1 Phénotype de maturation mégacaryocytaire 18
a. Progéniteurs 18
b. Marqueurs de maturation des précurseurs 18
3.2.1.2 Processus d'endomitose 19
3.2.1.3 Signalisation mégacaryocytaire 20
3.2.1.4 Facteurs de transcription mégacaryocytaires 22
3.2.2 Différentiation érythroïde 23
3.2.2.1 Phénotype de maturation érythroïde 23
3.2.2.3 Erythropoïèse et métabolisme du fer 24
3.2.2.2 Signalisation érythroïde 25
3.2.2.3 Facteurs de transcription érythroïdes 27

II LES NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES 29
1 Polyglobulie de Vaquez 29
1.1 Epidémiologie et étiologie 29
1.2 Diagnostic 30
2 Thrombocytémie Essentielle 30
2.1 Epidémiologie 30
2.2 Diagnostic 30
3 Myélofibrose 31
3.1 Epidémiologie 31
3.2 Diagnostic 31
4 Evolution 32
4.1 Thrombose 32
4.2 Saignements 33
4.3 Myélofibrose 33
4.4 Leucémie aiguë myéloblastique 33
5 Physiopathologie des Néoplasies Myéloprolifératives 33
5.1 Signalisation JAK2 dans la physiologie hématopoïétique 33
5.2 Mutation initiatrices des NMP Phi- 35
5.2.1 JAK2 35
5.2.2 *JAK2V617F* : 1 même mutation, 3 phénotypes 37
5.2.2.1 La charge allélique *JAK2V617F* 37
5.2.2.2 Conséquences de la signalisation différentielle de *JAK2V617F* dans les PV, TE et MF 37
5.2.2.3 Rôle des modificateurs génétiques constitutionnels dans le phénotype NMP 38
5.2.3 La Calréticuline 38
5.2.4 MPL 39
5.3 Mutations initiatrices et modèles animaux 40
5.4 Physiopathologie cellulaire des NMPs 41
5.5 Corrélations clinico-biologiques liées aux mutations initiatrices dans les NMP 42
5.5.1 JAK2 dans les PV 42
5.5.2 TE 42
5.5.3 Myélofibroses 43

5.6 Mutations additionnelles dans les NMP 43
5.6.1 Pronostic dans les PV et TE 44
5.6.2 Pronostic dans les MF 45
5.7 Cas des NMP triples négatifs 46
6 Traitements 46
6.1 Phlébotomie 46
6.2 Aspirine 46
6.3 Anagrélide 46
6.4 Hydroxyurée 47
6.5 Interféron-α 47
6.5.1 Historique de l'utilisation dans les hémopathies myéloïdes : la LMC 47
6.5.2 Efficacité clinique dans les NMP classiques 48
6.5.3 Ciblage spécifique de clone : *JAK2V617F* 48
6.5.4 Spécificité de clone plus générale 49
6.5.5 Inefficacité sur certains clones 49
6.5.6 Effets immunomodulateur 49
6.5.7 Activité sur les cellules souches normales et leucémiques 50
6.6 Ruxolitinib 51
6.7 Autres agents cytoréducteurs 52
6.8 Greffe de moelle osseuse 52
III LA SENESCENCE 53
1 Rôles physiologiques de la sénescence 53
2 Les différentes phases cellulaires 54
3 Mécanismes de sénescence 54
3.1 Sénescence et cycle cellulaire 54
3.1.1 Mécanismes généraux 54
3.1.2 Implication de p53 56
3.2 Inducteurs de sénescence 57
3.2.1 La sénescence réplicative 57
3.2.2 Dérépression du locus *CDKN2A* 58
3.2.3 La sénescence prématurée 58
3.2.3.1 Les dommages à l'ADN 59
3.2.3.2 Le stress de culture et les espèces réactives de l'oxygène 59
3.2.3.3 L'activation oncogénique 59
3.2.3.4 Le phénotype de sécrétion 60
3.3 Sénescence PML-dépendante 61
3.3.1 Généralités et structure de PML 61
3.3.2 Mécanismes de sénescence associés à PML 63
3.3.2.1 Isoforme IV 63
3.3.2.2 Interactions avec p53 et ses partenaires 63
3.3.2.3 Indépendance de p53 64
3.3.2.4 Réorganisation de la chromatine 64
3.3.2.5 Régulation par l'Interféron 65
3.3.2.6 Régulation par l'Arsenic 65
a. Histoire de l'utilisation de l'Arsenic 65
b. LAP et mécanisme d'action 66
4 Marqueurs utilisés pour mettre en évidence la sénescence 67
5 Sénescence et Hématopoïèse 69
5.1 Cellules souches hématopoïètiques et vieillissement 69
5.2 Mégacaryopoïèse 70
6 Echappement à la sénescence dans les cancers 70
7 Thérapeutiques antitumorales pro-sénescentes 70
7.1 Thérapies pro-sénescence 71
7.2 Thérapies sénolytiques 71
7.3 Inhibition du SASP 72
8 Conclusion : nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la sénescence dans les hémopathies 73

DEUXIEME PARTIE: RATIONNEL DU PROJET ET OBJECTIFS 74

1ERE PARTIE : CARACTERISATION DE NOUVEAUX VARIANTS MOLECULAIRES DANS LES NMP 74

2EME PARTIE : ETUDE DES EFFETS DE L'IFN ET DE SA COMBINAISON A L'AS_2O_3 DANS LES NMP *JAK2V617F* 75

TROISIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES 77

I COMPOSES ET PLASMIDES 77
II LIGNEES CELLULAIRES ET CELLULES PRIMAIRES 77
III ESSAIS DE PROLIFERATION 77
IV IMMUNOFLUORESCENCE 77
V EXPERIENCES DE SA-B-GALACTOSIDASE 78
VI QUANTIFICATION DES TRANSCRIPTIONS DE GENES PAR PCR QUANTITATIVE 78
VII EXPERIENCES DE CLONOGENICITE 78
VIII GENOTYPAGE 78
IX TRANSDUCTIONS VIRALES 78
X ANALYSE DU CYCLE CELLULAIRE ET APOPTOSE 79
XI WESTERN BLOT 79
XII ÉCHANTILLONS DE PATIENTS 79
XIII ANALYSES STATISTIQUES 79

QUATRIEME PARTIE : RESULTATS 80

I EXPRESSION DIFFERENTIELLE DE PML ET STATUT JAK2 80
1. Expression totale de PML 80
2. Expression des CN-PML 82
2.1 Lignées cellulaires 82
2.2 Cellules primaires CD34+ 84
II EFFETS SUR LA PROLIFERATION ET LA CLONOGENICITE 86
1. Lignées cellulaires 86
2. Cellules primaires CD34+ 88
2.1 Clonogénicité 88
2.2 Prolifération en milieu liquide 88
2.3 Effet sur les CSH de NMP 89
III MECANISME D'ACTION CELLULAIRE DE L'IFN ET DE L'AS_2O_3 91
1. Cycle cellulaire 91
2. Apoptose 93
3. Induction de Sénescence cellulaire 93
3.1 Lignées cellulaires 93
3.2 Cellules primaires CD34+ 94
IV DEPENDANCE A PML 97
1. Inactivation de PML 97
2. Effets des drogues 98
2.1 Lignée cellulaire mutée JAK2V617F 98
2.2 Cellules primaires CD34+ de NMP 101

DISCUSSION 103

ARTICLE N°1 110

ARTICLE N°2 118

ARTICLE N°3 123

ARTICLE N°4 130

REFERENCES 132

Liste des abréviations

ADN: Acide désoxyribonucléique

AGM: Aorto-gonado-mesonephros

ARC: Association pour la recherche contre le cancer

ARF: Alternative reading frame

ASXL1 : Additional sex combs like 1

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3 related

ATRA : Acide tout trans-rérinoïque

BCL11A: B-cell lymphoma/leukemia 11A

BET : Bromodomain and extraterminal domain

BFU-E: Burst forming unit-erythroid

BFU-MK: Burst forming unit-megakaryocytes

BMP: Bone morphogenic protein

BRD4: Bromodomain-containing protein 4

BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine

CALR: Calreticulin

CBP: CREB bing protein

CD: Cluster of differentiation

CDK: Cyclin-dependant kinase

CDK2: Cyclin dependant kinase 2

CDK4: Cyclin dependant kinase 4

CDKN2A: Cyclin dependent kinase inhibitor 2A

CEBPa: CCAAT/enhancer-binding protein alpha

CEL-NOS: Chronic eosinophilic leukemia-Not otherwise specified

CFU-E: Colony forming unit-erythroid

CFU-MK: Colony forming unit-megakaryocytes

CHC: Carinome hépato-cellulaire

CHK1: Checkpoint kinase 1

CHK2: Checkpoint kinase 2

CK1: Casein kinase 1

CK2: Casein kinase 2

CLP : Common lymphoid progenitor

CMP : Common myeloid progenitor

CN-PML: Corps nucléaires-Promyelocytic leukemia

CREB: C-AMP response element-binding protein

CSH : cellule souche hématopoïétique

DC : Dendritic cell

DCR2 : Decoy death receptor-2

DDR: DNA damage response

DEC1 : Defective chorion-1

DNMT3A: DNA methyltransferase 3A

E2F: E2 factor

EP: Erythroid progenitor

EPO: Erythropoïétine

ERFE: Erythroferrone

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

ETS: Erythroblast transformation specific

EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

FDA: Food and Drug Administation

FLI1 : Friend leukemia integration 1

FOG1 : Friend of GATA1

FT: Facteur de transcription

GADD45b: Growth Arrest And DNA Damage Inducible Beta

GATA-1 : GATA binding protein 1

GB : Globules blancs

G-CSF: Granulocyte-cell stem factor

GDF11 : Growth differentiation factor 11

GIPSS: Genetically inspired prognostic scoring system

GMO: Greffe de moelle osseuse

GMP : Granulocytic-monocytic progenitor

GP: granulocytic progenitor

Hb: Hémoglobine

HDAC: Histone deacetylase

HIPK2: Homeodomain-interacting protein kinase 2

HU : Hydroxyurée

IFN: Interféron alpha

IGF-1: Insulin-like growth factor 1

IGR: Institut gustave roussy

IL6 : Interleukine 6

IL8 : Interleukine 8

INK4: Inhibitors of CDK4

IPSET: International prognostic score for essential thrombocythemia

JAK2: Janus kinase 2

JH1: Janus homology 1

JH2: Janus homology 2

KI: Knock-in

KLF1: Kruppel-like transcription factor 1

KO: Knock-out

LAM : Leucémie aiguë myéloblastique

LAP: Leucémie aiguë promyélocytaire

LDF1: Lysis defective 1

Lin: Lineage

LMC: Leucémie Myéloïde Chronique

LTC-IC: Long term culture-initiating cells

LT-HSC: Long term-Hematopoietic stem cell

MAF: Musculoaponeurotic Fibrosarcoma

MAPK: Mitogen-activated protein kinases

MCP : Membrane cofactor protein

MDM2: murine double minute 2

MEP : Megakaryocytic-erythroid progenitor

MF : Myélofibrose

MFP : Myélofibrose primitive

MIP: Major intrinsic protein

MIPSS: Mutation-enhanced international prognostic scoring system

MK: Megakaryocyte

MkP : Megakaryocytic progenitor

MPL: Myeloproliferative leukemia

MPN-U: Myeloproliferative neoplasm, unclassifiable

MPP : Multipotent progenitor

MPT : Modifications post-traductionnelles

NES : Nuclear export sequence

NFE2 : Nuclear factor erythroid 2

NK: Natural killer

NLS : Nuclear localization sequence

NMP: Néoplasies Myéloprolifératives

OIS : Oncogene-induced senescence

OMS: Organisation mondiale de la santé

PAI-1: Plasminogen activator inhibitor 1

peg-IFN: pegylated interferon alpha

PF4: Platelet factor 4

PI3K : Phosphoinositol-3-phosphate kinase

PML: Promyelocytic leukemia

PTEN: Phosphatase and Tensin homolog

PU.1 : Purine 1

PV : Polyglobulie de Vaquez

PVSG: Polycythemia vera study group

RARa: Retinoic acid receptor alpha

RAS : Rat sarcoma

Rb: Rétinoblastome

RE: Réticulum endoplasmique

REC: Réseau érythroïde central

ROS: Reactive oxygen specis

RUNX1 : Runt-related transcription factor 1

SAHF: Senescence-associated heterochromatin foci

SASP: Senescence-associated secretory phenotype

SA-β-Gal : Senescence-associated beta galactosidase

SBC: Syndrome Budd-Chiari

scATAC-seq: single cell ribonucleic acid sequencing

SCF: Stem cell factor

scRNA-seq: single cell ribonucleic acid sequencing

SDF: Senescence-associated DNA damage *foci*

SF3B1: splicing factor 3b subunit 1

SRSF2: Serine and Arginine rich splicing factor 2

STAT : Signal transducer and activator of transcription

ST-HSC: Short term- Hematopoietic stem cell

SUMO: Small ubiquitin-like modifier

TAL1: T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1

TE : Thrombocytémie essentielle

TERT: Telomerase reverse transcriptase

TET2: Ten eleven translocation 2

TGFβ: Transforming growth factor beta

THS: Thrombose Hépato-Splanchnique

TIS : Therapy-induced senescence

TN: Triple négatif

TNFα : Tumor necrosis factor alpha

TP: Thrombose porte

TPO: Thrombopoïétine

TRAIL: tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand

TRIM: Tripartite motif

UBC9 : Ubiquitin conjugating enzyme 9

VHL : Von hippel

vWF: von Willebrand Factor

WT: Wild type

Table des Illustrations

Figures

Figure 1 : Lieux de production des cellules hématopoïétiques dans le corps humain

Figure 2 : Isolement et caractérisation des cellules souches hématopoïétiques

Figure 3 : La hiérarchie hématopoïétique classique

Figure 4 : Arbres de différenciation des cellules souches hématopoïétiques fœtales et adultes

Figure 5 : Étapes de la différenciation mégacaryocytaire

Figure 6 : Schéma de la différenciation mégacaryocytaire centré sur les étapes d'endomitoses

Figure 7 : Signalisation mégacaryocytaire en aval de l'activation de MPL par la TPO

Figure 8 : Modèle de programmation de la divergence érythro-mégacaryocytaire

Figure 9 : Etapes de différenciation du progéniteur érythroïde mégacaryocytaire au globule rouge mature

Figure 10 : Modèle de régulation hormonale de la demande en fer par l'érythropoïèse

Figure 11 : Processus et signalisation érythroïde

Figure 12 : Réseau érythroïde central des facteurs de transcription de la différentiation érythroïde

Figure 13 : Activation différentielle des JAK par les récepteurs de cytokines

Figure 14 : Distribution des mutations JAK2, MPL et CALR dans les trois types de Néoplasies Myéloprolifératives

Figure 15 : Structure et domaines de JAK2

Figure 16 : Modèle d'activation de la voie JAK-STAT dépendante et indépendante des cytokines dans le cas de la mutation *JAK2V617F*

Figure 17 : Modèle d'activation de la voie JAK-STAT dans le cas de mutations de la Calréticuline

Figure 18 : Modèle d'activation de la voie JAK-STAT en aval de l'activation du récepteur MPL

Figure 19 : Rôle central des mégacaryocytes dans la physiopathologie des Néoplasies Myéloprolifératives

Figure 20 : Paysage mutationnel et fréquence des mutations additionnellles dans les Néoplasies Myéloprolifératives

Figure 21 : Caractéristiques phénotypiques des cellules sénescentes

Figure 22 : Cycle cellulaire et mécanismes moléculaires généraux

Figure 23 : Voie d'activation de la sénescence p53 dépendante

Figure 24 : Devenir des télomères dysfonctionnels

Figure 25 : Voies d'activation causales de la sénescence

Figure 26 : Immunofluorescence de corps nucléaires à PML (CN-PML) dans des progéniteurs hématopoïétiques normaux

Figure 27 : Structure du gène PML et de ses isoformes protéiques générées par épissage alternatif

Figure 28 : Modifications post-traductionnelles de PML

Figure 29 : Mécanisme d'action de l'As_2O_3 dans le modèle de la LAP

Figure 30 : Modèle de guérison de la LAP par combinaison de thérapie comprenant l'As_2O_3

Figure 31 : Marqueurs phénotypiques et moléculaires utilisés pour mettre en évidence un processus de sénescence

Figure 32 : Formation de CN-PML et fonctions en aval

Figure 33 : Expression transcriptionnelle et protéique de PML dans les lignées myéloïdes HEL, UKE, UT-7 JAK2 WT (WT) et UT-7 *JAK2V617F* (V617F)

Figure 34 : Expression des CN-PML dans les lignées UT-7 JAK2 WT (UT-7 WT) et UT-7 *JAK2V617F* (V617F).

Figure 35 : Expression des CN-PML dans la lignée HEL *JAK2V617F*

Figure 36 : Expression des CN-PML dans des CD34+ de donneurs sains (DS) ou de patients atteints de NMP et mutés *JAK2V617F*

Figure 37 : Efficacité du traitement par IFN, As_2O_3 ou la combinaison des deux drogues sur les cellules *JAK2V617F*

Figure 38 : Effets différentiels du traitement par IFN, As_2O_3 ou la combinaison des deux drogues sur les compartiments immatures *JAK2V617F*

Figure 39 : Cycle cellulaire des UT-7 *JAK2 WT* (WT) ou *JAK2V617F* (V617F) traitée ou non par IFN, As_2O_3 ou IFN+As_2O_3

Figure 40 : Le traitement par IFN+ As_2O_3 induit la sénescence des cellules UT-7 mutées *JAK2V617F*

Figure 41 : Le traitement par IFN+ As_2O_3 induit la sénescence des progéniteurs de NMP mutés *JAK2V617F*

Figure 42 : Inhibition de l'expression de PML dans la lignée HEL

Figure 43 : Effets de l'IFN et de l'As_2O_3 sur des cellules HEL inactivées ou non pour PML

Figure 44 : L'efficacité du traitement par IFN+As_2O_3 sur les progéniteurs de patients NMP dépend de PML

Figure 45 : Mécanismes moléculaires de l'IFN sur les cellules souches hématopoïétiques

Tableaux

Tableau 1 : Principales caractéristiques des différentes cellules sanguines circulantes chez l'Homme adulte

Tableau 2 : Critères OMS 2016 pour le diagnostic de la MFP

Première partie : INTRODUCTION

I Hématopoïèse humaine

1. Définition

L'hématopoïèse est un processus actif et hiérarchisé qui permet la génération de toutes les cellules sanguines à partir d'une seule cellule souche hématopoïétique (CSH). Chez l'adulte, il prend place dans la moelle osseuse située dans les os plats et longs (Figure 1). Ce mécanisme est finement régulé par de multiples facteurs intrinsèques et extrinsèques qui permettent la différenciation en un lignage cellulaire particulier. A chaque étape, les cellules perdent leur potentiel de différenciation en se spécialisant en un lignage hématopoïétique particulier. Les progéniteurs hématopoïétiques dérivent des cellules souches et sont des cellules engagées dans le processus de différenciation encore capables de donner plusieurs types cellulaires. Ils se différencient ensuite en précurseurs, cellules morphologiquement identifiables, capables de se différencier en un seul lignage afin d'aboutir aux cellules matures circulantes.

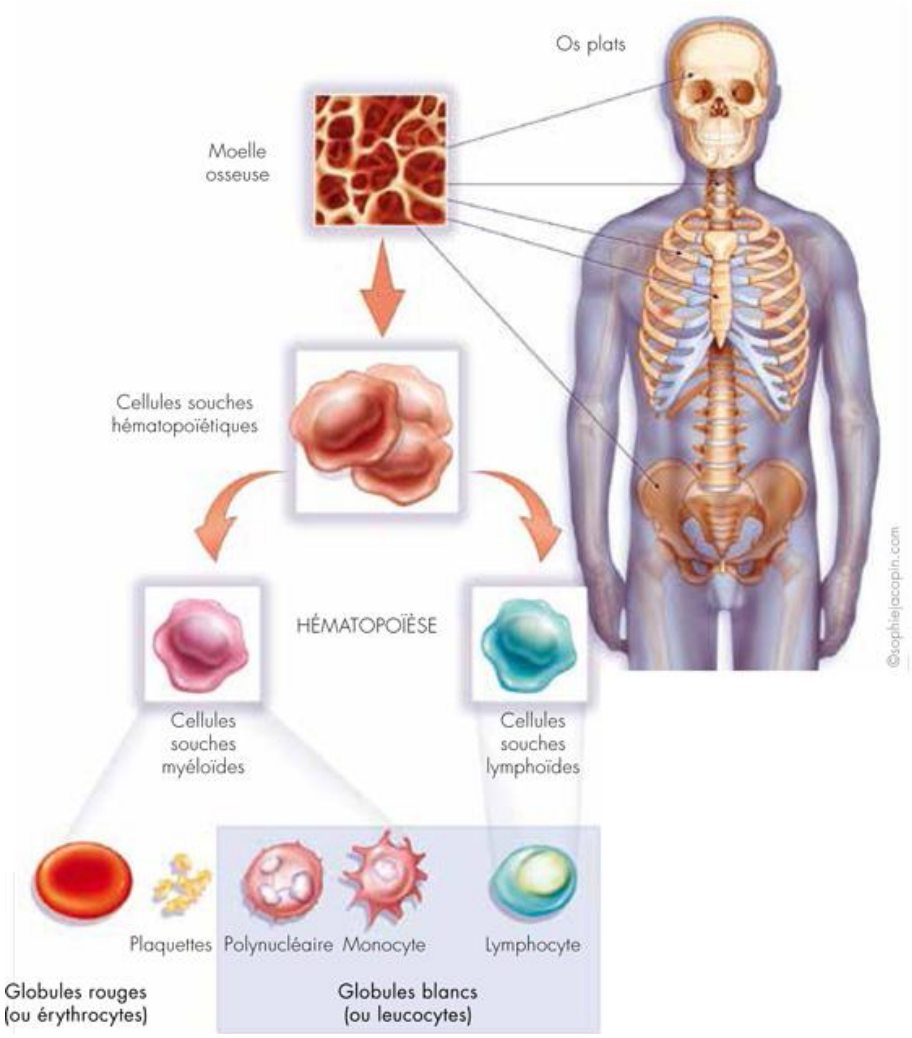


Figure 1 : Lieux de production des cellules hématopoïétiques dans le corps humain. La moelle osseuse localisée dans les os plats et longs (stenum et crêtes iliaques prinicpalement) est le lieu de production chez l'adulte (*d'après Fondation ARC, 2013*).

Chez un homme adulte environ 10^{12} cellules sanguines sont produites quotidiennement dans la moelle osseuse, afin de renouveler le stock de cellules matures (Tableau 1). Les mécanismes de régulation de l'hématopoïèse permettent une augmentation rapide d'un ou plusieurs types cellulaires en cas de situation de stress hématopoïétique (infection, blessure, anémie…).

Nom			Durée de vie sanguine	Quantité moyenne dans le sang	Proportion moyenne dans le sang	Fonction principale
Erythrocyte			120 jours	4-6 T/L	94%	Transport O_2
Plaquette			8-12 jours	150-400 G/L	5%	Hémostase
Leucocytes (GB)	**Polynucléaires**	**Neutrophile**	24h	1.5-7.5 G/L	45-75% des GB	Immunité anti-infectieuse
		Eosinophile	4-5h	<0.5 G/L	1-3% des GB	
		Basophile	3-4 jours	<0.1 G/L	<1% des GB	
	Monocyte		24h	0.1-1 G/L	3-8% des GB	Immunité
	Lymphocyte		Variable (jours à années)	1-4 G/L	20-40% des GB	Immunité

Tableau 1 : Principales caractéristiques des différentes cellules sanguines circulantes chez l'Homme adulte (*d'après Chesnais et al, 2015*). G : Giga, T : Tera, GB : Globules Blancs.

2. Les cellules souches hématopoïétiques

2.1 Définition

Le concept de CSH a été initialement démontré chez le cochon d'inde. En effet, il a été observé dans ce modèle, que l'injection dans la moelle de cellules de rate permettait de reverser les effets délétères des radiations sur le système hématopoïétique[1]. L'identification de cellules capables de s'auto-renouveler et de se différencier en formant des colonies dans la rate de souris préalablement irradiées a finalement permis d'asseoir le concept de CSH[2].

Les CSH se définissent comme des cellules indifférenciées ou multipotentes et représentent environ 0,001% des cellules médullaires. Elles sont caractérisées par 3 propriétés essentielles:

- l'auto-renouvellement qui permet de maintenir le stock existant de CSH

- la capacité à se différencier et à donner tous les types cellulaires hématopoïétiques

- la quiescence : elles sont bloquées en phase G0 du cycle cellulaire

On distingue 2 types de CSH dans la moelle. Les CSH dormantes (ou quiescentes) se divisent un nombre de fois limité dans la vie d'un adulte et présentent une activité métabolique très limitée. Elles servent essentiellement de réservoir et ne sont activées qu'en cas de stress hématopoïétique, tels que des atteintes pathologiques de la moelle osseuse ou après stimulation par le G-CSF qui entraîne leur mobilisation périphérique depuis la moelle vers le sang. Elles représentent moins d'un quart des CSH totales. Les CSH actives permettent quant à elles de produire quotidiennement les cellules sanguines grâce à une machinerie de réplication et un métabolisme actifs[3]. Une étude basée sur le suivi de la longueur des télomères dans des granulocytes a permis d'estimer que les CSH actives effectuent, chez l'homme, une division cellulaire toutes les 45 semaines[4].

Le nombre limité de division cellulaire des CSH est conservé chez les espèces, ce qui suggère que la quiescence est un mécanisme de protection contre les erreurs de réplication qui conduisent à l'émergence de mutations pouvant entraîner des hémopathies[5].

2.2 Isolement

La séparation des CSH peut se faire en cytométrie en flux, en fonction de la présence ou de l'absence de marqueurs membranaires. Cependant, seuls les tests fonctionnels permettent de déterminer la réelle identité d'une CSH en démontrant sa capacité d'auto-renouvellement et de reconstitution de l'hématopoïèse chez la souris immunodéprimée. Ainsi, les CSH sont des cellules capables de proliférer en culture en absence de cytokines sur une sous-couche de cellules stromales ou de reconstituer une hématopoïèse humaine chez la souris irradiée (Figure 2).

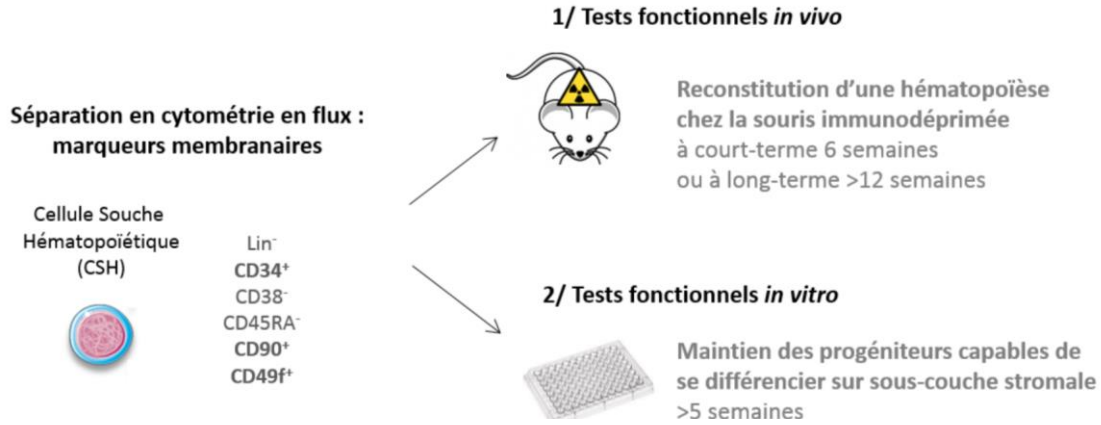


Figure 2 : Isolement et caractérisation des cellules souches hématopoïétiques. Les cellules sont isolées en cytométrie en flux selon les marqueurs de cellules souches définies par Notta et al, 2016. La fonctionnalité souche est explorée *in vivo* par la capacité de transplantation dans des souris immunodéprimées et *in vitro* par la capacité à maintenir une différenciation en culture avec cellules stromales au-delà de 5 semaines (*d'après Chesnais et al, 2015*).

La première population contenant des CSH a été isolée dans la population médullaire exprimant le marqueur CD34, mais n'exprimant ni le CD38, ni aucuns marqueurs de lignage (Lin-) tels que le CD14, le CD15 et le CD33 pour les cellules myéloïdes, le CD235a et le CD233 pour les cellules érythroïdes et le CD19, le CD3 et le CD8 pour la lignée[6]. Cependant cette population comprend moins de 1% de cellules capables de greffer chez la souris. L'identification de nouveaux marqueurs a permis d'augmenter la pureté de la population de CSH isolée en cytométrie en flux : environ 10% des cellules lin- CD34+ CD38- CD45RA- CD90+ CD49f+ sont capables de repopulation après xénogreffe chez la souris[7].

Des tests fonctionnels permettent de caractériser et de mettre en évidence différentes catégories de CSH *in vivo* et *in vitro*. Au cours de leur maturation, les CSH perdent leur capacité d'auto-renouvellement. Ainsi il est possible de différencier les CSH à court terme (ST-HSC pour Short-term Hematopoietic Stem Cell) capables de greffer transitoirement chez la souris immunodéprimée et les CSH à long-terme (LT-HSC pour Long-term Hematopoietic Stem Cell), plus immatures, qui se maintiennent plus de 12 semaines après transplantation chez la souris[8]. Les cellules capables d'initier des cultures à long terme sur cellules stromales médullaires, qui soutiennent la différenciation humaine myéloïde et lymphoïde, sont appelées LTC-IC (Long Term Culture-Initiating Cells) et forment une population cellulaire multipotente et hétérogène. Il est également possible de différencier plusieurs types de LTC-IC en fonction de leur durée de maintien in vitro : les ELTC-IC (Extend Long Term Culture-Initiating Cells) sont capables de se maintenir plus de 8 semaines sur sous-couche stromale[9]. Différentes lignées de soutien peuvent être utilisées. La lignée murine stromal-5 (MS5) a été obtenue à partir de cellules médullaires de souris irradiée[10] et est classiquement utilisée pour produire des LTC-IC[11]. Elles permettent de retarder la différenciation des CD34+ CD38- en maintenant leur capacité de prolifération et la présence du marqueur CD34 à la surface des cellules.

3. Différenciation hématopoïétique

3.1 Progéniteurs hématopoïétiques

3.1.1 Selon le modèle classique

Les progéniteurs dérivent directement des CSH et sont des cellules multipotentes médullaires rares capables de proliférer et de se différencier en plusieurs types cellulaires. Il en existe plusieurs types.

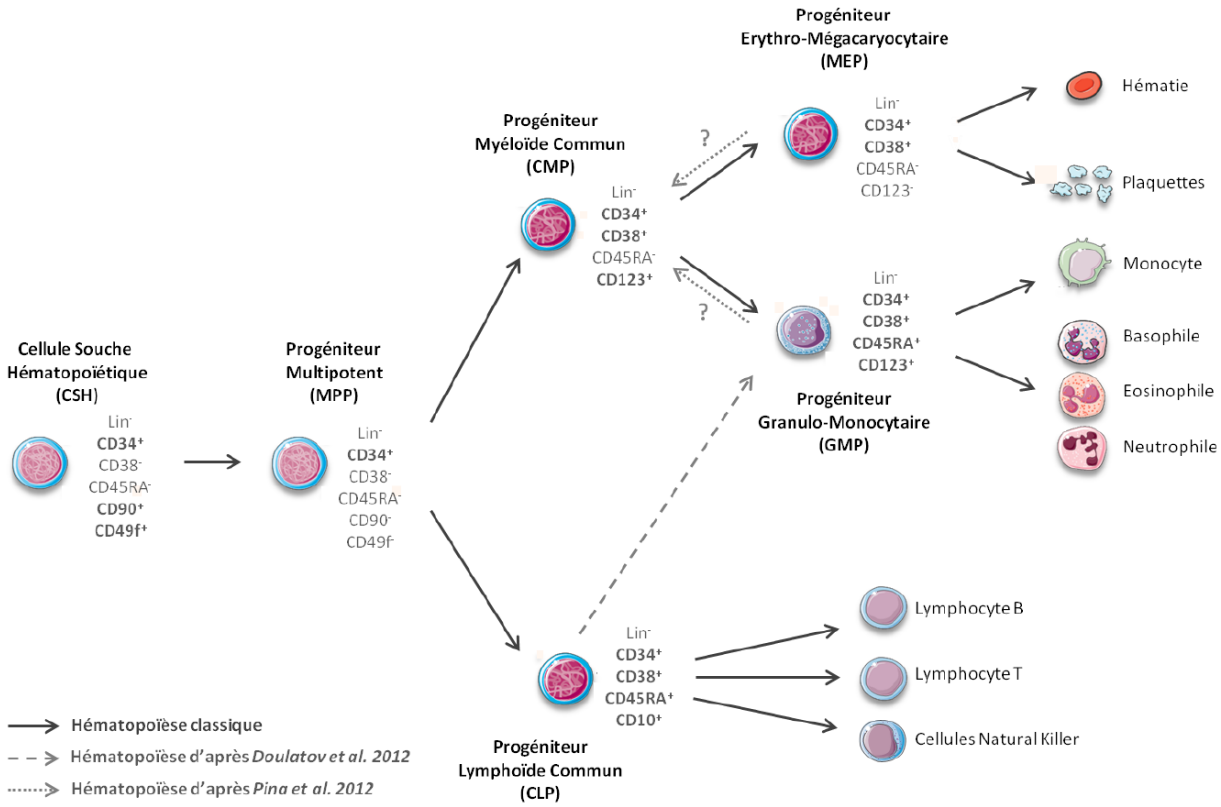


Figure 3 : La hiérarchie hématopoïétique classique. Dans ce modèle classique, les CSH se situent au sommet de la hiérarchie et différencient en MPP avec une capacité d'auto-renouvellement réduite. En aval des MPP, une la séparation entre les progéniteurs myéloïdes (CMP) et lymphoïdes (CLP) est la première étape dans l'engagement de lignée. Les CMP peuvent générer des MEP et des GMP. Les CLP donnent naissance aux lymphocytes et cellules dendritiques. Les MEP se différencient en plaquettes et érythrocytes. Les GMP produisent des granulocytes, monocytes, et les cellules dendritiques. Cependant, les données démontrant que les CLP conservent un potentiel de différentaition myéloïde et que les progéniteurs myéloïdes tardifs (MEP et GMP) ont la capacité de se dédifferencier remettent déjà en partie le modèle classique en question (*d'après Chesnais et al, 2015*).

Les progéniteurs multipotents (MPP pour Multipotent Progenitor) sont les plus immatures. Ils peuvent se différentier en progéniteurs myéloïdes communs (CMP pour Common Myeloid Progenitor) à l'origine des lignées mégacaryocytaires et érythroïdes via leur différenciation en progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP pour Megakaryocyte Erythroid Progenitor) et des lignées granuleuses et monocytaires via leur différenciation en progéniteur granulo-monocytaire (GMP pour Granulocyte Macrophage Progenitor). Les MPP sont aussi à l'origine des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP pour Common Lymphoid Progenitor) qui se différencient ensuite en lymphocytes B, T et en cellules Natural Killer (Figure 3).

Les MPP sont caractérisés par le marquage CD34+CD38-CD90-. Les progéniteurs myéloïdes peuvent être isolés chez l'homme au sein de la population CD34+CD38+ sur la base de la présence ou de l'absence des marqueurs CD123 qui code pour le récepteur à l'interleukine-3, et CD45RA qui code pour une tyrosine phosphatase membranaire[12]. Au final, la population CD34+CD38+CD123+CD45RA- correspond aux CMP. L'acquisition du marqueur CD45RA accompagne la différenciation des CMP en GMP, tandis que la perte du marqueur CD123 est associée à leur différenciation en MEP. Les CLP sont

définis les marqueurs membranaires CD45RA et CD10 qui code pour la neprilysin, une endopeptidase membranaire[13].

La détection du potentiel clonogénique par culture sur milieu semi-solide permet également de caractériser les progéniteurs hématopoïétiques qui sont capables de former des colonies identifiables morphologiquement.

Dans le modèle classique proposé de l'hématopoïèse, l'orientation myéloïde ou lymphoïde des progéniteurs est un événement dichotomique précoce au cours duquel les CMP subissent une première restriction myéloïde avant de perdre leur potentiel de différenciation en lymphocytes B et lymphocytes T. Du côté lymphoïde, des études portant sur des CLP isolés ont mis en évidence que ces cellules conservent un potentiel de différenciation myéloïde et sont capables de donner des monocytes *in vitro* mais aussi *in vivo* après xénogreffe chez la souris[14]. De plus le phénotype des cellules semble réversible : en effet des cellules engagées vers une différenciation érythroïde ou granuleuse sont capables de se dédifférencier *in vitro*[15]. Ces travaux laissent supposer une plasticité de l'hématopoïèse avec des progéniteurs engagés qui conservent un potentiel de différenciation multi-lignée et sont capables de se dédifférencier dans certaines conditions.

3.1.2 Selon le modèle revisité

Bien que le modèle classique ait été très utile pour comprendre le processus de différenciation des CSH, il convient de noter qu'il présente certaines lacunes en ce sens qu'il simplifie à l'excès la complexité des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC), et qu'il n'est basé que sur les marqueurs de surface et la transplantation à l'aide d'un ensemble finalement hétérogène de cellules. L'analyse des cellules en « bulk » suppose que chaque cellule, qui a le même phénotype, possède une fonction identique. Avec les progrès des technologies étudiant le transcriptome, l'épigénétique et même le protéome des cellules à l'échelon unicellulaire et par ailleurs des modèles génétiques de souris, ce modèle classique a été remis en question au cours des dernières années, notamment concernant la mégacaryopoïèse. En conséquence, de nouveaux types de HSPC ont été identifiés et étudiés de manière approfondie en raison de leurs biais de lignée.

Au niveau des CSH, cette hétérogénéité a été d'abord mise en évidence en utilisant l'analyse par dilution limite et la transplantation de cellules individuelles. Ainsi, les groupes de Sieburg et d'Eaves ont défini les CSH à polarisation myéloïde, équilibrée et lymphoïde en se basant sur le rapport entre la production de cellules myéloïdes et lymphoïdes[16,17]. En outre, les CSH à biais mégacaryocytaire ont également été signalés comme un sous-ensemble se situant au sommet de la hiérarchie hématopoïétique[18]. Pronk et al[19] ont utilisé le CD150, CD105 (Endogline), CD41 et CD16/32 pour reséparer les progéniteurs myéloïdes LSK. Dans la population LSK-, les cellules CD41+CD150+ sont définies comme des progéniteurs mégacaryocytaires, qui sont exclusivement associés à la génération de mégacaryocytes. Les cellules CD41-CD150- CD16/32+ sont des GMP.

Conformément aux travaux mentionnés ci-dessus, un document de référence du laboratoire d'Amit rapportant les transcriptomes de plus de 2 600 cellules progénitrices myélo-érythroïdes LSK de souris[20] et un travail ultérieur du laboratoire de Gottgens rapportant les transcriptomes de 1 600 HSPC[21] ont tous deux révélé l'hétérogénéité des progéniteurs de LSK.

Les groupes Trumpp[3] et Passegué[22] ont ensuite divisé la population de MPP en quatre sous-populations en fonction de leur immuno-phénotype, de l'état du cycle cellulaire, du biais de lignée, de la résistance aux traitements médicamenteux et de l'abondance de la moelle osseuse. Les MPP1 sont plus proches des ST-CSH, qui ont une capacité de reconstitution de lignées multiples jusqu'à 4 mois lors de la

première transplantation, tandis que les MPP2/3/4 sont dépourvues de potentiel d'auto-renouvellement et ne présentent qu'une capacité de reconstitution myéloïde à court terme (<1 mois).

Concernant la différenciation en CMP et en MEP, le groupe de Dick a trié les MPP, les CMP et les MEP du foie fœtal et de la moelle osseuse adulte, et a comparé leur potentiel de lignée à partir de différents stades de développement[7]. Ils ont montré que les MPP, les CMP et les MEP définis précédemment sont hétérogènes. Il est important de noter que les MEP du foie fœtal et de la moelle osseuse produisent uniformément des clones uniquement érythroïdes. Par conséquent, les MEP définies classiquement sont principalement des précurseurs érythroïdes lorsqu'elles sont analysées à la résolution d'une seule cellule et ne sont pas des progéniteurs de mégacaryocytes/érythroïdes comme on le pensait auparavant, ce qui est cohérent avec l'observation de Pronk et al[19]. Il est intéressant de noter que le foie fœtal contient un grand nombre de progéniteurs oligopotents distincts. Cependant, peu de progéniteurs oligopotents étaient présents dans la moelle osseuse adulte. Au lieu de cela, seules deux classes de progéniteurs prédominent, multipotentes et unipotentes, avec des lignées de mégacaryocytes/érythroïdes émergeant des cellules multipotentes (Figure 4).

Les nouvelles technologies développées au cours des dix dernières années ont ainsi permis d'ouvrir les yeux sur les multiples possibilités d'évolution de chaque compartiment hématopoïétique.

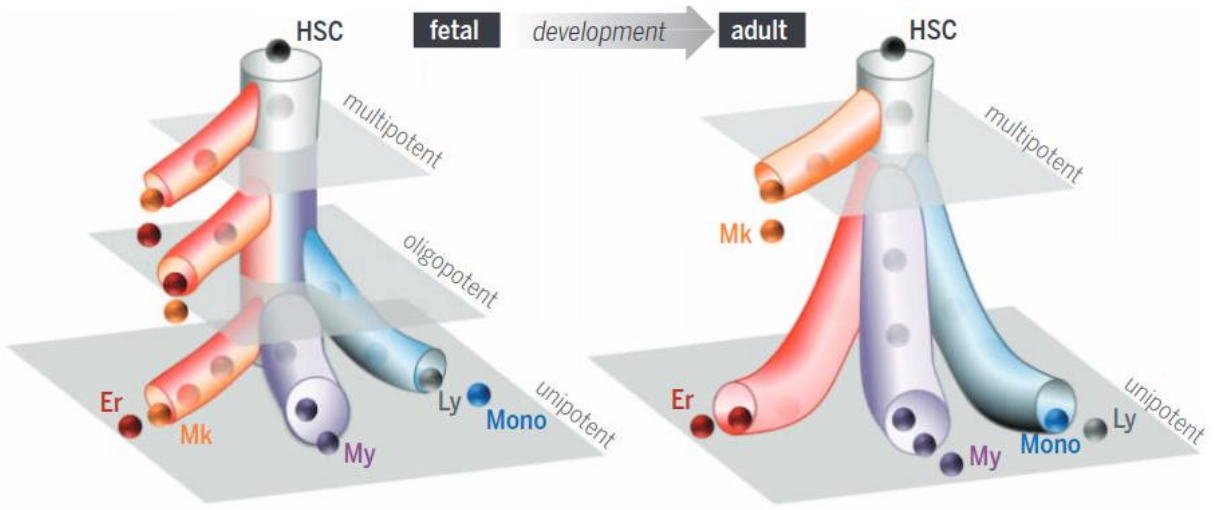


Figure 4 : Arbres de différenciation des cellules souches hématopoïétiques fœtales et adultes. Le modèle redéfini propose une modification de développement dans l'architecture des cellules progénitrices du fœtus, où de nombreux types de cellules souches et progénitrices sont multipotentes, à l'adulte, où le compartiment des cellules souches est multipotent mais les progéniteurs sont unipotents. Les plans grisés représentent les niveaux théoriques de différenciation (*d'après Notta et al, Science, 2016*).

3.2 Différenciation terminale

Les précurseurs hématopoïétiques sont les cellules immatures les plus engagées dans le processus de différenciation. Ils dérivent de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques et sont spécifiques d'un lignage : lymphoïde, granuleux, monocytaire, érythroïde ou mégacaryocytaire. Ce sont les premières cellules morphologiquement identifiables de l'hématopoïèse qui donnent naissance

aux cellules matures grâce à plusieurs étapes successives de différenciation terminale. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux processus de maturation mégacaryocytaire et érythroïde.

3.2.1 Différentiation mégacaryocytaire

3.2.1.1 Phénotype de maturation mégacaryocytaire

a. Progéniteurs

Chez l'homme, les progéniteurs mégacaryocytaires ont été initialement caractérisés par l'expression de marqueurs de différenciation à leur surface qui sont également présents sur d'autres progéniteurs hématopoïétiques, tels que le CD34, CD31 et CD133. Sur la base de l'expression de HLA-DR, il est possible de distinguer les BFU-MK (HLA-DRlow) et CFU-MK (HLA-DRhigh)[23]. Les progéniteurs mégacaryocytaires tardifs peuvent également être isolés dans la population CD34+CD41+ qui est enrichie en CFU-MK.

b. Marqueurs de maturation des précurseurs

Le CD41a (GPIIb) ou le CD41b (complexe GPIIb/IIIa) semble relativement spécifique de la lignée mégacaryocytaire en particulier chez l'adulte, bien que les cellules mastocytaires puissent exprimer cette intégrine[24]. Le CD41 est présent sur une petite fraction de cellules médullaires $CD34^+$ (environ 3%). Ces cellules $CD34^+CD41^+$ sont enrichies en progéniteurs mégacaryocytaires mais elles ne comprennent pas toutes les CFU-MK. L'expression du CD41 précède l'apparition d'autres protéines plaquettaires majeures dont le CD42. Cependant le CD42 est présent sur une fraction de cellules $CD34^+CD41^{+}$[25]. Ainsi les cellules $CD34^+CD41^+CD42^-$ correspondent aux vraies CFU-MK alors que les cellules $CD34^+CD41^+CD42^+$ donnent naissance à des mégacaryocytes uniques ou des groupes de moins de 4 mégacaryocytes. L'expression en surface du CD42 correspond à une étape de différenciation tardive et est associée à une augmentation importante de l'expression de MPL, de la GPVI, de l'intégrine β2α1 et de la détection des protéines contenues dans les granules α, telles que le PF4 (facteur 4 plaquettaire) ou le vWF (facteur von Willebrand). Ensuite, l'expression de ces différentes protéines plaquettaires augmente fortement alors que l'antigène CD34 disparaît durant le processus d'endomitose[26] (Figure 5).

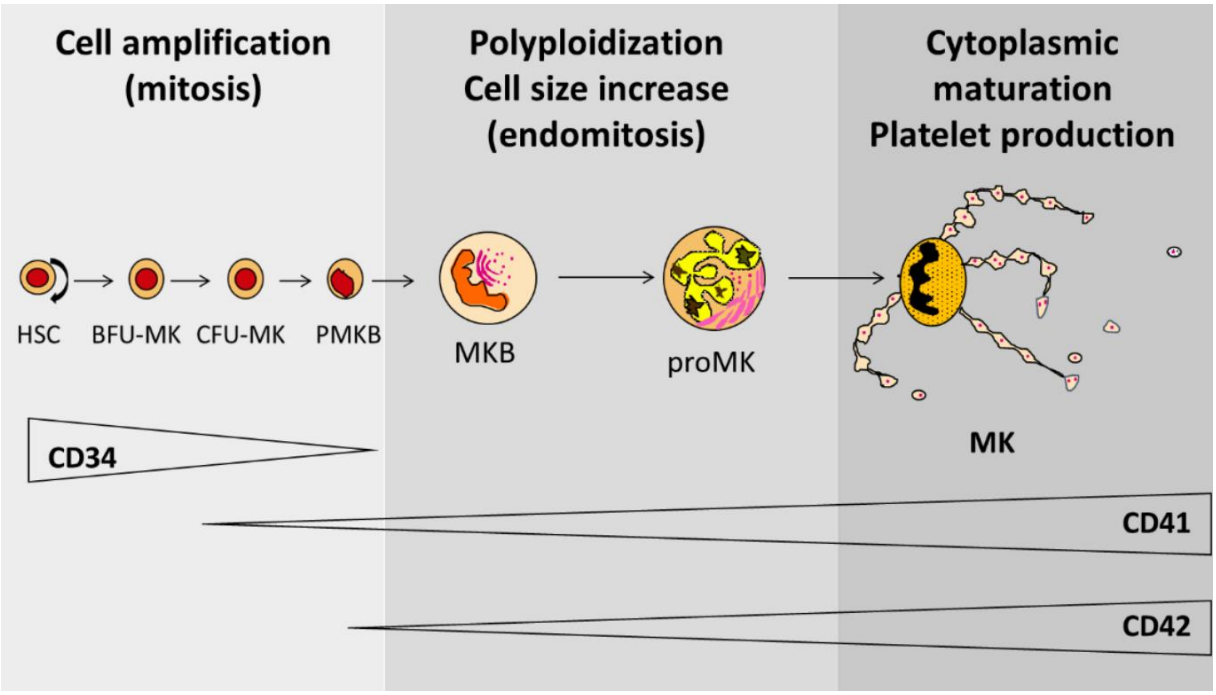


Figure 5 : Étapes de la différenciation mégacaryocytaire nécessaires à la production de plaquettes à partir de cellules CD34+. Les principales étapes au cours de la différenciation cellulaire et finalement la production de plaquettes ainsi que le phénotype de maturation sont indiqués (*d'après Mazzi et al, 2018*).

3.2.1.2 Processus d'endomitose

Un progéniteur mégacaryocytaire typique réalise de 3 à 6 cycles de divisions cellulaires, divisions permettant de former de 8 à 64 cellules filles. Au stade de précurseur mégacaryocytaire (aussi appelé promégacaryoblaste), les cycles habituels des cellules diploïdes sont remplacés par le cycle cellulaire d'endomitose, l'un des aspects les plus remarquables de la maturation des mégacaryocytes (Figure 6). Le mégacaryocyte est une des rares cellules à être polyploïde durant sa différenciation normale ce qui la différencie d'autres cellules devenant polyploïdes en réponse à un stress (Figure 6).

Une fois ce processus d'endomitose terminé, les cellules individuelles possèdent de 2 à 64, voire 128 fois le matériel chromosomique normal dans un noyau unique, hautement lobé "polyploïde". Comme leur nom l'indique, les mégacaryocytes sont des cellules de très grande taille (jusqu'à 300 nm en culture), qui nécessitent une capacité de synthèse protéique massive, assurée par la transcription simultanée des copies multiples de chaque gène spécifique mégacaryocytaire dans une seule cellule.

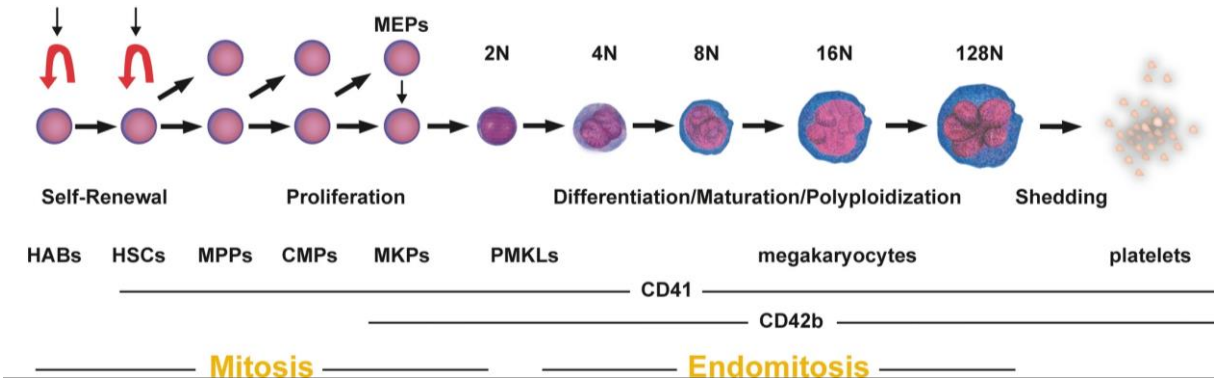


Figure 6 : Schéma de la différenciation mégacaryocytaire centré sur les étapes d'endomitoses successives de 2N à 128N soit quatre phases d'endomitoses avant la formation des plaquettes. HABs, hémangioblastes; HSCs, cellules souches hématopoïétiques; MEPs : progeniteurs megacaryocyte-erythrocyte; MKPs : progeniteurs megakaryocytaires; MKs : megacaryocytes; MPPs : progeniteurs multipotents; PMKLs : promegakaryoblastes; TPO, thrombopoïétine (d'après *Yang et al , BJH, 2016*)

3.2.1.3 Signalisation mégacaryocytaire

Le développement des mégacaryocytes est régulé à de multiples niveaux par différentes cytokines, dont la plus critique est la TPO (Figure 1). La TPO, dont le récepteur est MPL (pour v-MPL, Myeloproliferative leukemia virus), a été découvert et cloné en 1994. Il a été démontré qu'elle favorisait le développement et la maturation des mégacaryocytes à partir des CSH[27–31].

La TPO régule principalement la différenciation des mégacaryocytes à partir des CSH, et donc toutes les cellules progénitrices prêtes à devenir des mégacaryocytes, y compris les CSH, les CMP et les MEP, expriment MPL[32]. Cette régulation est le résultat d'une boucle de rétrocontrôle : la TPO est produite de manière constitutive par le foie, circule ensuite dans le plasma où elle est séquestrée par les plaquettes circulantes de manière dépendante de MPL. Par conséquent, la réduction du nombre de plaquettes entraîne une augmentation des niveaux de TPO circulante qui est libre d'exercer ses effets stimulants sur les CSH de la moelle osseuse, augmentant ainsi le nombre de mégacaryocytes (et de plaquettes)[33–35].

La signalisation de la TPO entraîne l'internalisation du complexe récepteur-ligand MPL-TPO et l'activation de multiples voies de transduction du signal, notamment JAK2 (Janus kinase), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)/STAT5, MAPK (Mitogen-activated protein kinases)/ERK (Extracellular signal-regulated kinase), et PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/AKT (protéine kinase B)[36,37]. Plus précisément, la TPO induit la phosphorylation de JAK2 qui phosphoryle les cibles en aval, y compris l'activation des facteurs de transcription STAT3/STAT5[38]. La signalisation par ces voies provoque l'activation en aval de facteurs de transcription et la régulation de l'expression des gènes spécifiques aux mégacaryocytes (Figure 7). Des études menées sur des souris inactivées pour la *Thpo* et *Mpl* montrent une diminution globale des CSH, avec une réduction particulièrement drastique des mégacaryocytes et des plaquettes[32].

Sur un versant pathologie, la perte complète de MPL a pour conséquence une thrombopénie profonde (taux de plaquettes médian $<20\times10^9$/L), ce qui suggère tout de même que les patients sans

signalisation TPO fonctionnelle conservent une autre voie de production de plaquettes et qu'il existe des voies de mégacaryopoïèse indépendantes de la TPO chez les mammifères[39].

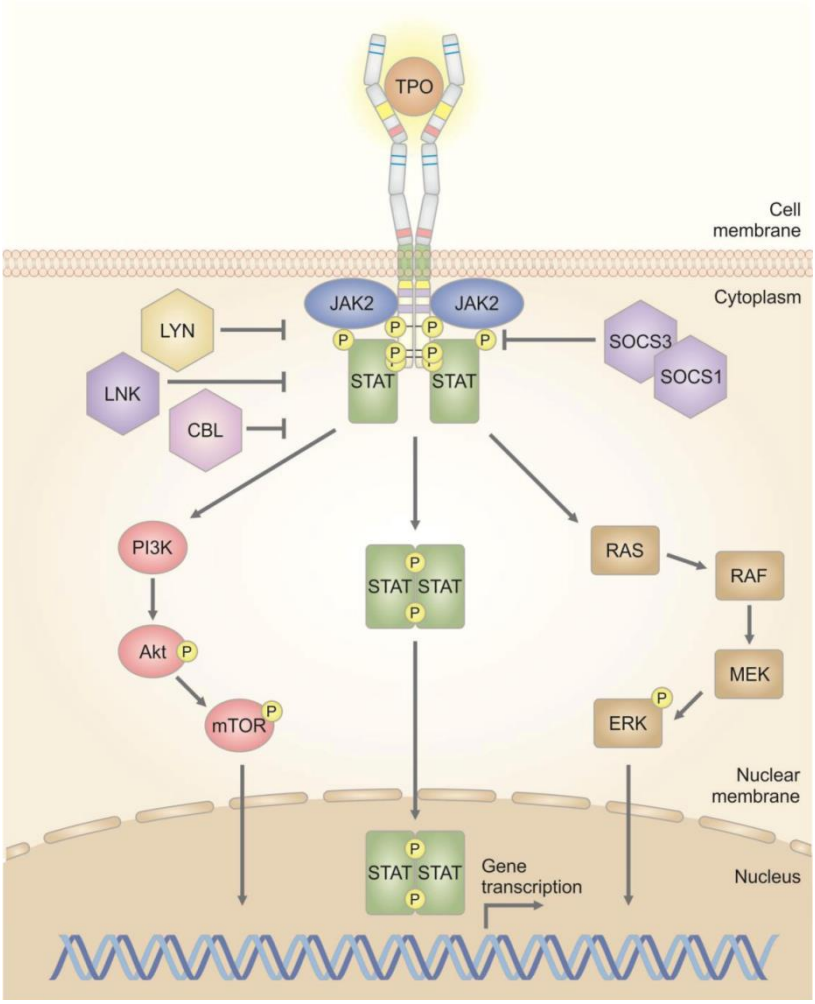


Figure 7 : Signalisation mégacaryocytaire en aval de l'activation de MPL par la TPO. La dimérisation du récepteur entraine le recrutement et l'activation par transphosphorylation de JAK2, qui va ainsi aller phosphoryler leur principal effecteur en aval, les STAT (en particulier STAT5), permettant la transcription de gènes cibles mégacaryocytaires. L'activation de JAK2 permet également l'activation des voies PI3K/Akt/mTOR ainsi que la voie des MAP kinases (*d'après Sangkhae et al, 2015*).

3.2.1.4 Facteurs de transcription mégacaryocytaires

La mégacaryopoïèse implique de multiples signaux extrinsèques et intrinsèques et est *in fine* des facteurs de transcription. Parmi les facteurs de transcription importants on peut citer GATA-1, Friend of GATA-1 (FOG-1), GATA-2, FLI-1, PU.1, NF-E2 et RUNX1 (AML1, CBFα2 ou PEBP2αB).

Une série d'expériences ont montré que GATA-1 est un régulateur central de la différenciation et de la maturation mégacaryocytaires. Les mégacaryocytes n'exprimant plus GATA-1 sont retardés dans leur maturation cellulaire, présentent une hyperprolifération marquée et génèrent moins de plaquettes élargies que la normale *in vivo*[40]. Une analyse de souris femelles hétérozygotes (qui portent un allèle GATA-1 actif de type sauvage ou mutant) a montré que GATA-1 était nécessaire pour la différenciation terminale des cellules érythroïdes et mégacaryocytaires définitives[41]. Wechsler et al. ont étudié la mégacaryopoïèse normale et maligne en fournissant des preuves qui relient les leucémies aiguës mégacaryoblastiques du syndrome de Down à la perte de la fonction normale de GATA-1[42]. GATA-1 participe à la régulation de la mégacaryopoïèse en recrutant divers corégulateurs de la chromatine, qui servent de médiateurs à l'activation et à la répression transcriptionnelle[43]. FOG-1, une protéine en doigt de zinc, interagit physiquement avec GATA-1 et stimule ou inhibe l'activité de GATA-1 selon le contexte de la cellule et du promoteur, et cette interaction est essentielle à la différenciation mégacaryocytaire[44,45]. FOG-1 recrute le complexe répresseur érythroïde pour assurer la répression transcriptionnelle par GATA-1 pendant la mégacaryopoïèse[46,47], et les bases moléculaires de cette interaction ont été révélées[48] (Figure 8A).

FLI-1 est un membre de la famille de facteurs de transcription en hélice alpha ETS qui lient une séquence consensus riche en purine, GGA (A/T). Il a été démontré qu'il est un régulateur essentiel de la mégacaryopoïèse[49]. Les embryons de souris *Fli-1-null* meurent en cours de gestation, et il a été démontré que les mégacaryocytes, d'origine fœtale et de la région AGM (Aorto-gonado-mesonephros), sont bloqués au début du stade de différenciation selon les tests de clonogénicité[50,51]. Des études plus approfondies ont montré que FLI-1 est un régulateur majeur des derniers stades de la différenciation mégacaryocytaire[52] et peut coopérer avec GATA-1 pour activer l'expression des gènes associés à la différenciation terminale des mégacaryocytes[53] (Figure 8A).

Le facteur de transcription NF-E2, un complexe protéique hétérodimérique composé de p45 et de petites protéines de la famille MAF, initialement identifié comme un facteur de transcription érythroïde, est également crucial pour la bonne différenciation des mégacaryocytes. L'expression forcée de p45-NF-E2 améliore sélectivement de nombreux aspects de la différenciation des mégacaryocytes, notamment leur maturation, la formation des plaquettes et la libération des plaquettes. De plus, la surexpression de p45 augmente l'engagement de la mégacaryopoïèse précoce, tout en inhibant la différenciation des globules blancs[54]. Les souris dépourvues de p45 NF-E2 présentent une thrombocytopénie profonde résultant d'un arrêt de la maturation de la mégacaryopoïèse mature avec <5% du nombre de plaquettes détectables dans le sang périphérique de type sauvage[55].

RUNX1 régule négativement la différenciation terminale des mégacaryocytes et favorise la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires[56]. RUNX1 interagit avec d'autres facteurs de transcription tels que GATA-1[57,58] et FLI-1[59]. Un profil d'occupation de RUNX1 à l'échelle du génome a été établi à partir de modèles de lignées cellulaires. Les résultats suggèrent qu'en différenciant les lignées cellulaires mégacaryocytaires, RUNX1 coopère avec GATA1, AP-1 et ETS pour orchestrer des programmes de transcription spécifiques aux cellules grâce à des partenariats dynamiques de facteurs de transcription[60] (Figure 8B).

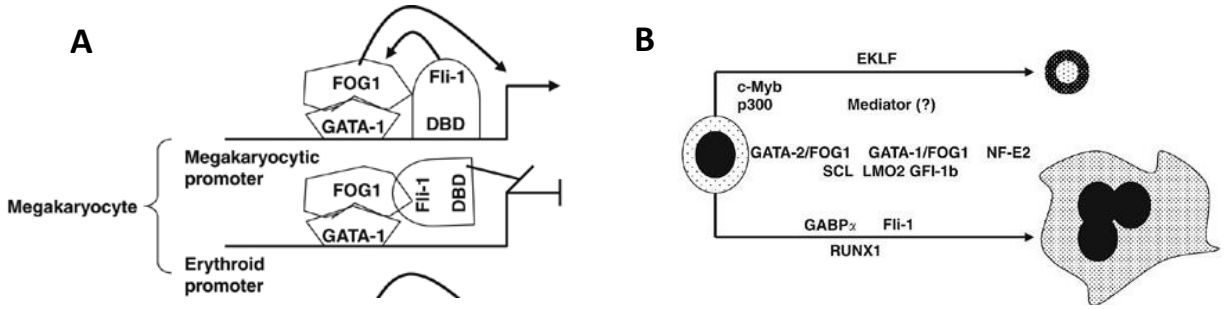


Figure 8 : (A) Un modèle de programmation de la divergence érythro-mégacaryocytaire, décrivant les contributions des facteurs de partage des lignées (par exemple, GATA-1 et FOG1), des facteurs de sélection des lignées (par exemple, Fli-1) et des sites de liaison des promoteurs. Ce modèle tient compte des complexes GATA-1/FOG1 des mégacaryocytes activant les promoteurs des mégacaryocytes et réprimant les promoteurs érythroïdes. (B) Diagramme des facteurs de transcription impliqués dans la divergence de la lignée d'un progéniteur commun mégacaryocyte-érythroïde. Les facteurs sont organisés sur l'axe des y en fonction du degré de sélectivité de la lignée (*d'après Goldfarb et al, Oncogene, 2007*)

3.2.2 Différentiation érythroïde

3.2.2.1 Phénotype de maturation érythroïde

Les progéniteurs érythroïdes engagés sont identifiés au sein d'amas de colonies appelées BFU-E puis maturent en CFU-E, nommées ainsi de par leur capacité à former des colonies dans des milieux semi-solides (Figure 9). La BFU-E est la plus précoce colonie érythroïde progénitrice engagée et peut former des colonies beaucoup plus grandes que les CFU-E. Si les BFU-E et les CFU-E peuvent être distinguées fonctionnellement et enrichies grâce à l'expression de marqueurs de surface, leur morphologie ne peut pas être distinguée des progéniteurs issus de lignées différentes. Les BFU-E et les CFU-E se différencient en outre en précurseurs érythroïdes ayant des morphologies distinctes. Le premier précurseur érythroïde morphologiquement identifiable est le proérythroblaste, qui se différencie séquentiellement en érythroblaste basophile, polychromatophile et orthochromatique, qui peut ensuite s'énucléer pour former un réticulocyte. Les précurseurs montrent une réduction progressive de la taille des cellules et des noyaux, tandis que la production d'hémoglobine augmente fortement. Les globules rouges représentent environ 95% des cellules circulantes dans le sang. En pratique, on pourrait presque résumer l'hématopoïèse humaine à la synthèse des hématies.

L'enrichissement progressif des cellules progénitrices et des précurseurs érythroïdes a permis de mieux comprendre les bases moléculaires de la différenciation érythroïde physiologique et pathologique (Figure 9). Plusieurs groupes ont proposé des stratégies permettant d'enrichir les MEP humaines à partir de la fraction des cellules progénitrices qui expriment les CD34 et CD38 en l'absence de marqueurs de lignée[12,14,61]. Cependant, il est clair que ces populations de MEP sont extrêmement hétérogènes et contiennent probablement des progéniteurs érythroïdes engagés. L'expression du CD105 (endogline) a été suggérée pour marquer l'une des premières étapes de l'engagement érythroïde[62].

Des travaux indépendants ont permis un enrichissement significatif des BFU-E et des CFU-E sur la base de l'expression des marqueurs CD34, CD36, CD71 et CD45RA à partir de sous-fractions de sang de

cordon, de moelle et de sang périphérique[63]. Des précurseurs érythroïdes humains plus différenciés peuvent être isolés par l'expression de surface du récepteur de la transferrine (CD71) et de la glycophorine A (CD235a). Des marqueurs utilisés plus récemment, notamment α4-integrin (CD49d) et la bande 3, ont montré qu'ils amélioraient la résolution des différentes étapes de la différenciation des précurseurs érythroïdes[64]. De même, les progéniteurs et précurseurs érythroïdes de souris peuvent être enrichis en utilisant diverses combinaisons de marqueurs de surface cellulaire, notamment CD71, glycophorine A (Ter119), CD44 et KIT[65,66]. Comme il existe des stratégies multiples et parfois contradictoires pour isoler les populations de progéniteurs et de précurseurs érythroïdes, les futures recherches comparant le chevauchement des marqueurs proposés permettront d'isoler et de caractériser des populations de plus en plus pures provenant de sources diverses (Figure 9).

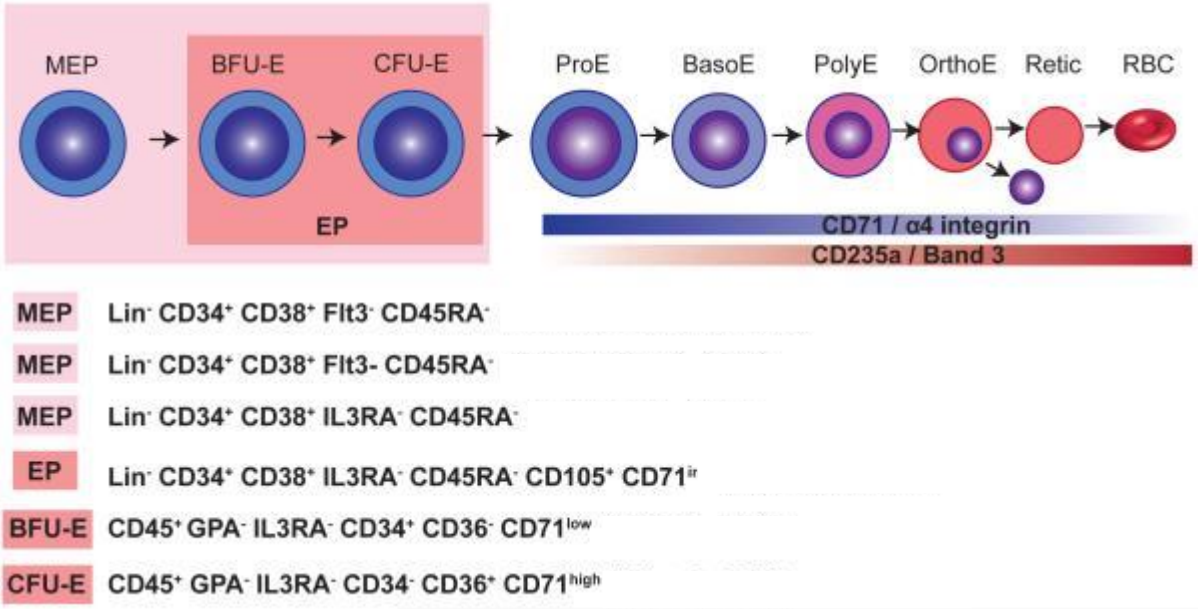


Figure 9 : Les étapes de différenciation du progéniteur érythroïde mégacaryocytaire (MEP) au globule rouge mature (RBC) sont montrées. Un aperçu des stratégies récentes visant à isoler ces types de cellules à partir de marqueurs de surface est donné. Il est à noter que les stratégies actuelles d'isolement des MEP semblent également contenir des BFU-E et des CFU-E. MEP, progéniteur érythro-mégacaryocytaire ; BFU-E, unité formant colonie de blastes - érythroïde ; CFU-E, unité formant colonie - érythroïde ; ProE, proérythroblaste ; BasoE, érythroblaste basophile ; PolyE, érythroblaste polychromatophile ; OrthoE, érythroblaste acidophile; Retic : réticulocyte (*d'après Nadakumar et al, BJH, 2016*).

3.2.2.3 Erythropoïèse et métabolisme du fer

L'érythropoïèse est le principal consommateur de fer chez l'homme et les autres vertébrés. En diminuant la transcription du gène codant pour l'hormone de régulation du fer, l'hepcidine, l'EPO stimule l'absorption du fer, ainsi que la libération du fer provenant des macrophages de recyclage et des réserves dans les hépatocytes[67,68]. Le principal régulateur érythroïde de l'hepcidine est l'érythroferrone (ERFE), synthétisée et sécrétée par les érythroblastes dans la moelle et les sites extramédullaires[69]. La production d'ERFE est induite par l'érythropoïétine (EPO) et est également proportionnelle au nombre total d'érythroblastes sensibles. L'ERFE agit sur les hépatocytes pour

supprimer la production d'hepcidine, par un mécanisme encore inconnu qui implique la voie de la protéine BMP (Figure 10). En supprimant l'hepcidine, l'ERFE facilite l'apport en fer pendant l'érythropoïèse de stress, mais contribue également à la surcharge en fer dans les anémies dont l'érythropoïèse est inefficace[70]. Bien que la plupart de ces mécanismes aient été définis dans des modèles murins, les études réalisées à ce jour indiquent que la physiopathologie de l'ERFE est similaire chez l'homme.

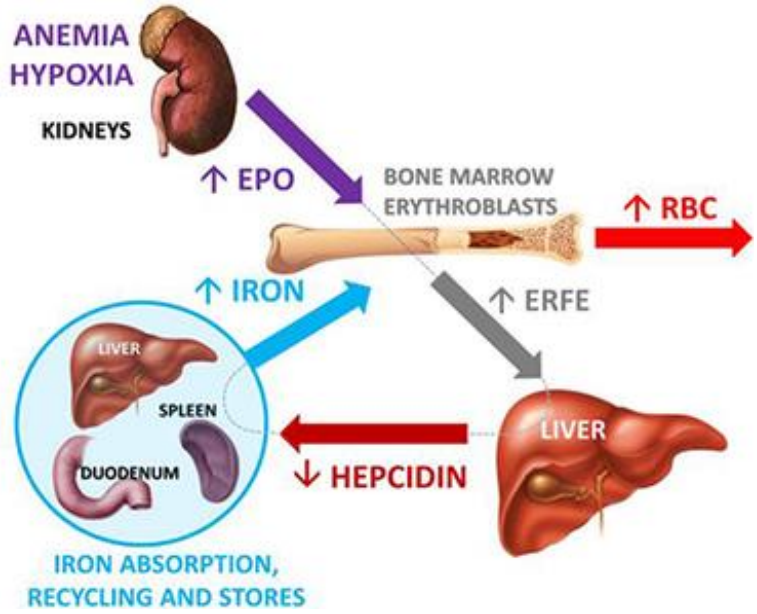


Figure 10 : Modèle de régulation hormonale de la demande en fer par l'érythropoïèse. Pendant la réponse physiologique, l'anémie provoque une augmentation de la sécrétion d'EPO par les reins. Sous l'effet de l'EPO, davantage d'érythroblastes entrent dans le pipeline de différenciation érythropoïétique et la sécrétion d'ERFE stimulée par l'EPO augmente, réduisant la production d'hepcidine et faisant ainsi correspondre l'apport en fer (provenant de la rate, du foie et du duodénum) à une érythropoïèse accrue. (*d'après Ganz et al, 2019*).

3.2.2.2 Signalisation érythroïde

Plusieurs cytokines et facteurs de croissance ont un rôle essentiel dans l'érythropoïèse. L'une des cytokines les plus étudiées est l'érythropoïétine (EPO). L'EPO agit principalement sur les progéniteurs érythroïdes et les précurseurs précoces. Les CFU-E ont besoin d'EPO pour survivre pendant la culture cellulaire *in vitro*, ainsi que pour former des colonies dans des milieux de méthylcellulose. Certains BFU-E ou progéniteurs précoces peuvent nécessiter de l'EPO et certaines données suggèrent que le récepteur de l'EPO peut être exprimé sur ces cellules progénitrices (avec une apparition au cours du stade BFU-E), au moins chez la souris[71].

Même si l'EPO est nécessaire pour les systèmes de culture in vitro, les populations de BFU-E et de CFU-E peuvent être trouvées chez les souris inactivées pour le gène de l'*Epo* ou de l'*Epor*, bien qu'elles

meurent toutes deux au stade du foie fœtal avec le début de l'érythropoïèse définitive[72]. Bien qu'il ait initialement été suggéré que cette signalisation n'était pas indispensable pour l'érythropoïèse primitive du sac vitellin, une récente analyse minutieuse de ces mutants suggère un rôle critique pour la maturation des cellules érythroïdes primitives également[73].

La protéine EPOR ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque et nécessite des facteurs accessoires (par exemple Janus kinase 2, JAK2) pour la signalisation en aval[74]. L'EPOR est activée lorsqu'une seule molécule d'EPO se lie à deux molécules d'EPOR de surface cellulaire et les dimérise efficacement[75–77] (Figure 11). La liaison de l'EPO induit une transphosphorylation de l'EPOR et de JAK2[78]. Cela active les protéines en aval telles que STAT5, ERK et les voies de la PI3kinase/AKT (Figure 11). Après activation, les régulateurs négatifs de l'EPOR (LNK, SOCS1, SOCS3…) diminuent les réponses[79–83]. L'interface d'interaction entre deux protéines JAK2 joue un rôle crucial dans son activation et que certaines situations pathologiques (mutation *JAK2V617F* ou *JAK2 Exon 12*) entrainent une augmentation de cette stabilité d'interaction conduisant à une activation constitutive de la voie JAK2/STAT5[84].

Un autre facteur de croissance bien étudié, le « Stem cell factor » (SCF, KITLG), se lie au récepteur KIT qui fonctionne comme un récepteur à activité tyrosine kinase[85]. Le SCF peut entrer en synergie avec l'EPO pour favoriser l'érythropoïèse[86]. Les souris *Scf-null* (mutants steel) et *Kit-null* (mutants W) ont un nombre réduit de colonies de CFU-E dans le foie fœtal[87]. De plus, le SCF peut indirectement phosphoryler l'EPOR par l'intermédiaire du récepteur KIT[86].

D'autres facteurs qui régulent positivement l'érythropoïèse comprennent l'insuline, l'IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), l'activine et l'angiotensine II. A l'inverse, Le TGFβ et un ligand apparenté, le GDF11, les cytokines inflammatoires telles que l'interféron γ, le TNFα et TRAIL ont tous des effets négatifs sur l'érythropoïèse[88,89]. L'implication précise de ces voies dans l'érythropoïèse *in vivo* reste à établir dans la plupart de ces modèles.

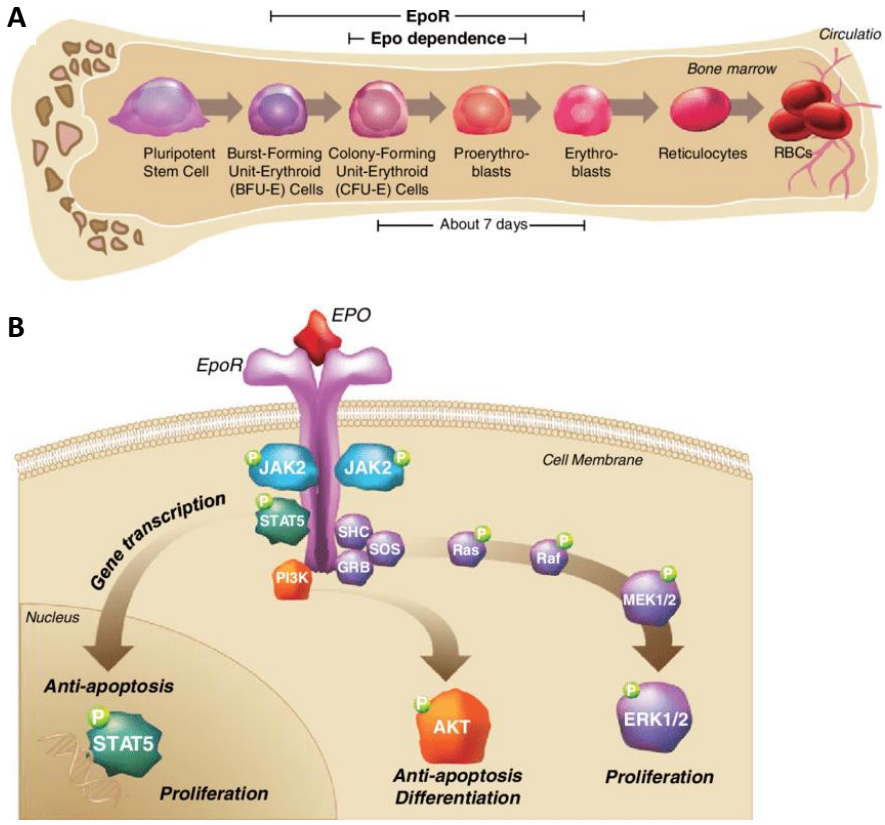


Figure 11 : Le processus d'érythropoïèse. (A) Les progéniteurs érythroïdes dans la moelle osseuse qui dépendent de l'EPO et de l'EPOR pour se différencier en globules rouges matures. (B) Les voies de signalisation stimulées par l'EPOR lors de la liaison à l'EPO EpoR : Récepteur de l'érythropoïétine Epo : érythropoïétine *(Eliott et al, Ann Hematol, 2014)*.

3.2.2.3 Facteurs de transcription érythroïdes

L'engagement des cellules progénitrices multipotentes dans le lignage érythroïde et leur différenciation ultérieure en globules rouges matures sont en fin de compte contrôlés par des FT qui régulent étroitement les gènes spécifiques de l'érythropoïèse, démontrant l'importance d'un réseau érythroïde central (REC) des FT pour un développement correct des globules rouges (Figure 10). Ce REC est composé de FT qui lient l'ADN : GATA1, TAL1 et KLF1 [90], ainsi que ceux qui ne se fixent pas directement à l'ADN : LDB1 et LMO2 (Figure 12A et B). Les souris n'exprimant pas l'un de ces FT du REC développent des troubles graves de l'érythropoïèse et, en général, ne survivent pas à une gestation. Chez l'homme, les mutations dans les gènes *GATA1* et *KLF1* donnent lieu à de multiples phénotypes d'anémie[91]. En outre, il a été démontré que ces facteurs co-occupent des éléments de régulation dans les érythroblastes à proximité des gènes érythroïdes et seraient donc dotés d'une activité « enhancer » plus importante et dépendante des modifications des histones[90,92,93]. La déficience d'un ou de plusieurs de ces FT déstabilise souvent la liaison de l'autre facteur aux éléments co-occupés. En dehors du REC, des rôles importants pour d'autres FT, souvent exigeant une coopération avec les principaux FT, ont

été mis en évidence dans l'érythropoïèse. Par exemple, BCL11A interagit avec GATA1 et est le principal régulateur du passage de l'hémoglobine fœtale à adulte[94].

Parmi les autres facteurs impliqués dans l'érythropoïèse on peut citer également ZFPM1/FOG1, NFE2, GFI1B, ETO2, TAF10, MYB et ZNF148/ZBP-89.

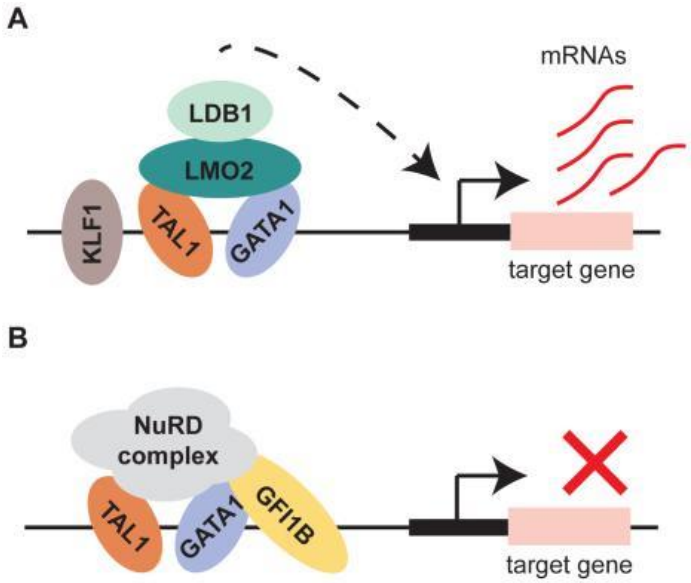


Figure 12 : Le réseau érythroïde central (REC) des facteurs de transcription (FT) est composé des FT se liant à l'ADN, GATA1, TAL1 et KLF1, ainsi que des FT ne se liant pas à l'ADN, LDB1 et LMO2. Le REC passe des enhancers aux promoteurs pour activer l'expression des gènes cibles. (B) Les FT du REC interagissent souvent avec des FT supplémentaires au niveau d'un sous-ensemble d'éléments réglementaires. Par exemple, GATA1 et TAL1 interagissent avec GFI1B et le complexe de désacétylases de remodelage des nucléosomes (NuRD), ce qui entraîne une répression du gène cible (*Nadakumar et al, BJH, 2016*).

II Les Néoplasies Myéloprolifératives

Les Néoplasies Myéloprolifératives (NMP) sont des hémopathies chroniques issues de la transformation maligne d'un progéniteur myéloïde et caractérisées par une prolifération anormale de multiples lignées de cellules myéloïdes matures, globules rouges, plaquettes et/ou globules blancs. Ces maladies touchent les adultes avec une incidence annuelle chez les personnes d'environ 1.2 à 5 cas pour 100 000 personnes par an tout âge confondu[95]. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) reconnaît 7 types de NMP[96]. La leucémie myéloïde chronique (LMC) a une incidence annuelle estimée à 0.9-1.8 cas par an et est caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie donnant naissance à la protéine de fusion BCR-ABL. Les NMP BCR-ABL-négatifs (également appelés chromosome Philadelphie-négatifs ou Ph-) comprennent la Polyglobulie de Vaquez (PV) (0.01-2.6 pour 100 000 habitants par an), la Thrombocytémie essentielle (TE) (0.2-2.3 pour 100 000 habitants par an) et la Myélofibrose Primitive (MFP) (0.2-1 pour 100 000 habitants par an). La leucémie chronique à neutrophile, la leucémie chronique à éosinophile - non spécifiée (CEL-NOS) et les NMP non classables (MPN-U) sont des types de NMP non classiques et moins fréquents.

1 Polyglobulie de Vaquez

La Polyglobulie de Vaquez (PV) est une hémopathie myéloïde chronique caractérisée par une anomalie des cellules souches hématopoïétiques entraînant une augmentation de la masse des globules rouges. La PV a été décrite pour la première fois à la fin du XIXe siècle par un médecin français, Louis Henry Vaquez, dans une étude de cas d'un homme de 40 ans souffrant de cyanose, de vertiges, d'une hypertrophie du foie et de la rate, et d'érythrocytose. Une décennie plus tard, William Osler a décrit de multiples patients atteints d'érythrocytose évoquant ainsi la ''maladie de Vaquez''[97]. Dans les années 1950, William Dameshek a observé que de nombreux patients atteints de PV présentaient une prolifération anormale des cellules érythroïdes, des mégacaryocytes et de la lignée granulocytaire, suggérant que le PV, la TE et la MFP sont phénotypiquement proches et créant ainsi le terme "désordres myéloprolifératifs"[98]. Une décennie plus tard, Louis Wasserman a créé le groupe d'étude sur la Polyglobulie de Vaquez (PVSG), qui définit les premiers critères diagnostiques de la PV. La notion de clonalité dans la PV dans les années 1970 a été démontrée de la façon suivante : les cellules de moelle osseuse de PV donnent naissance à colonies érythroïdes *in vitro* en l'absence de cytokines exogènes[99]. La décennie suivante a vu les premiers essais de traitement de la PV[100]. Une percée dans le diagnostic PV a été faite en 2005 avec la découverte de la mutation V617F dans la tyrosine kinase JAK2[101–104].

1.1 Epidémiologie et étiologie

L'incidence de la PV est d'environ 0.9 cas pour 100 000 habitants par an dans le monde[105]. L'âge médian du diagnostic est de 60 ans[106]. Le rapport entre les femmes et les hommes (H:F) varie de 1 à 2:1. Une prédisposition génétique a été suggérée dans certaines familles comme une cause de PV. Parmi les autres causes possibles figurent les rayonnements ionisants et l'exposition professionnelle aux toxines. Néanmoins, les causes sous-jacentes sont inconnues dans la majorité des cas. S'ils ne sont pas traités, les patients atteints de PV ont une espérance de vie considérablement réduite, principalement dû au risque de thrombose. La transformation en leucémie aiguë est la deuxième cause de mortalité la plus fréquente[107].

1.2 Diagnostic

Les principaux symptômes de la PV comprennent érythrose faciale, érythromélalgie (et des démangeaisons éventuellement intenses appelées également « prurit à l'eau chaude »), troubles neurologiques et de la vision et splénomégalie. Selon la dernière classification OMS [96], son diagnostic nécessite de répondre soit aux 3 critères principaux, soit aux 2 premiers critères principaux et au critère mineur[96].

Critères majeurs :

1. hémoglobine >16,5 g/dl chez les hommes ; hémoglobine >16,0 g/dl chez les femmes ou, hématocrite >49% chez les hommes ; hématocrite >48% chez les femmes ou masse des globules rouges augmentée de plus de 25% par rapport à la normale.

2. Biopsie ostéo-médullaire(BM) montrant une hypercellularité pour l'âge avec une prolifération des trois lignées (panmyélose), y compris une prolifération érythroïde, granulocytaire et mégacaryocytaire importante avec des mégacaryocytes pléiomorphes (différences de taille) et matures.

3. Présence de *JAK2V617F* ou Mutation de l'exon 12 de JAK2.

Critère mineur :

Taux d'érythropoïétine sérique sub-normal.

2 Thrombocytémie Essentielle

La Thrombocytémie Essentielle (TE) est une hémopathie myéloïde chronique caractérisée par une prolifération de cellules souches hématopoïétiques entraînant une augmentation du nombre de plaquettes. La TE a été décrite pour la première fois dans les années 1930 par deux pathologistes autrichiens Emil Apstein et Alfred Goedel[108]. 25 ans plus tard, les critères diagnostiques ont été définis pour la première fois[109]. Les principaux symptômes cliniques de la TE comprennent de maux de tête, de troubles de la vision, de thrombose, ou même hémorragiques. Elle est cependant majoritairement asymptomatique. Les complications les plus fréquemment observées regroupent des événements vasculaires occlusifs de localisation cérébrale, coronaire ou touchant les vaisseaux périphériques, ainsi que les hémorragies.

2.1 Epidémiologie

L'incidence de la TE est d'environ 1 cas pour 100 000 habitants par an dans le monde[105]. L'âge médian du diagnostic est de 56 ans[110]. Cependant, un deuxième pic de fréquence existe vers 30 ans. Le rapport H:F se situe entre 1:1-2. Comme tous les NMP, la TE est rarement observée chez les enfants[111]. Aucune étiologie n'a été documentée de manière évidente.

2.2 Diagnostic

Selon la dernière classification OMS, le diagnostic de TE nécessite de répondre aux 4 critères majeurs ou aux 3 premiers critères majeurs et au critère mineur[96].

Critères majeurs :

1. Nombre de plaquettes ≥450 × 10^9/l.

2. Biopsie ostéo-médullaire montrant une prolifération principalement de la lignée mégacaryocytaire avec un nombre accru de mégacaryocytes matures et de taille augmentée et des noyaux hyperlobés. Aucune prolifération des lignées granuleuse ou érythroïde et très rarement une augmentation mineure (grade 1) des fibres de réticuline.

3. Absence de critère diagnostic de l'OMS pour la LMC BCR-ABL1+, la PV, la myélofibrose primitive (MFP), un syndrome myélodysplasique ou une autre hémopathie myéloïde.

4. Présence d'une mutation JAK2, CALR ou MPL.

Critère mineur : Présence d'une mutation clonale ou absence de preuve de thrombocytose réactionnelle.

3 Myélofibrose

La myélofibrose primitive (MFP) est une hémopathie myéloïde chronique caractérisée par une anomalie de la cellule souche hématopoïétique ayant pour conséquence une prolifération incontrôlée de mégacaryocytes et de granulocytes dans la moelle osseuse. La MFP entraîne un développement progressif de la fibrose dans la moelle osseuse, ce qui conduit à une défaillance de celle-ci. La myélofibrose peut également être secondaire et survenir après une PV ou une TE[96].

3.1 Epidémiologie

La MFP est la plus rare des NMP classiques avec une incidence d'environ 0.5 cas pour 100 000 habitants[105]. De récentes données recueillies sur plus de 30 000 cas de NMP entre 2001 et 2012 retrouvent un âge médian au diagnostic de 70 ans. 20% des malades sont âgés de moins de 50 ans et 10% ont moins de 45 ans. Il existe une prédominance masculine avec un sex ratio de 2 pour 1. Une incidence plus élevée de MFP dans les populations juives d'origine Ashkénaze a été rapportée[112]. En termes de prévalence, les caucasiens semblent plus atteints que les sujets d'origine hispanique, asiatique ou afro-américaine[113].

3.2 Diagnostic

Le diagnostic de la MFP repose essentiellement sur la présence d'une mutation initiatrice, des anomalies à la biopsie médullaire évoquant une prolifération mégacaryocytaire, cellule maligne jouant un rôle central dans la physiopathologie, et sur des anomalies biologiques. En 2008 deux entités ont commencé à être distinguées : la MFP préfibrotique (préMFP), se traduisant cliniquement par une thrombocytose et souvent confondue avec une TE, et la MFP installée[114]. La classification de l'OMS de 2016 a séparé de manière claire la TE de la MFP préfibrotique, rendant ainsi la biopsie ostéo-médullaire obligatoire pour le diagnostic car ces deux maladies présentent malgré tout une évolution et un pronostic distincts. Les critères diagnostics différenciant la préMFP de la MFP avérée sont résumés dans le Tableau 2.

	Prefibrotic/early PMF (pre-PMF)	Overt PMF
Major criteria		
1	Megakaryocytic proliferation and atypia[b], without reticulin fibrosis > grade 1[c], accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis	Megakaryocyte proliferation and atypia[b] accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis (grade 2 or 3)
2	Not meeting WHO criteria for *BCR-ABL1* + CML, PV, ET, MDS, or other myeloid neoplasm	Not meeting WHO criteria for *BCR-ABL1* + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm
3	Presence of *JAK2, CALR, or MPL* mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker[d] or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis[e]	Presence of *JAK2*, *CALR*, or *MPL* mutation or in the absence, the presence of another clonal marker[d] or absence of evidence for reactive BM fibrosis[f]
Minor criteria		
1	Presence of one or more of the following, confirmed in two consecutive determinations: • Anemia not attributed to a comorbid condition • Leukocytosis ≥ 11×10^9/L • Palpable splenomegaly • LDH level above the upper limit of the institutional reference range	Presence of one or more of the following confirmed in two consecutive determinations: • Anemia not attributed to a comorbid condition • Leukocytosis ≥ 11×10^9/L • Palpable splenomegaly • LDH level above the upper limit of the institutional reference range • Leukoerythroblastosis

Tableau 2 : Critères OMS 2016 pour le diagnostic de la MFP. Les critères majeurs et mineurs permettant de différencier une préMFP d'une MFP installée sont indiqués. BM : Bone marrow, CML : Chronic myeloid leukemia, MDS, Myelodysplastic syndrome PV: Polycythemia vera, ET: Essential thrombocytemia (*Barbui et al, Blood Cancer J, 2016*).

4 Evolution

L'espérance de vie des patients atteints de NMP est inférieure à celle de la population générale et présente une médiane au moment du diagnostic estimée à 20, 14 et 6 ans pour la TE, la PV et la MFP, respectivement[115]. Les principales complications pour les patients atteints de PV et de TE sont les thromboses, les hémorragies et les transitions vers la myélofibrose ou la leucémie secondaire.

4.1 Thrombose

La thrombose dans les NMP varie de troubles microcirculatoires légers à des complications plus graves telles que les thromboses artérielles et veineuses. Les complications thrombotiques constituent la principale cause de morbidité et de mortalité représentant 45% du taux de mortalité dans la PV[107]. L'incidence de thrombose après diagnostic est de l'ordre de 3 % et 2 % par patient et par an pour la PV et la TE, respectivement[107,116]. Les facteurs de risque de thrombose comprennent l'âge[117], un hématocrite élevée[118], des leucocytes élevés[119,120] et une charge allélique *JAK2V617F* élevée[121], mais pas la présence de la mutation *CALR*[122] ni le taux de plaquettes[123].

Les NMP constituent notamment la première cause de thrombose hépato-splanchnique (THS) initialement décrites dans 50 % des Syndromes de Budd-Chiari (SBC). Le SBC est une maladie rare secondaire à une obstruction des veines sus-hépatiques ou de la portion rétro-hépatique de la veine cave inférieure. Son incidence est de l'ordre de 0,2 à 0,9 par million d'habitants par an et représente 25 % des thromboses portes (TP). La TP aiguë est définie par l'apparition récente d'un thrombus dans le tronc porte ou ses branches droite ou gauche. L'extension aux veines mésentériques peut entrainer un infarctus mésentérique qui est une complication grave avec une mortalité de 50 %. En l'absence de

reperméabilisation, la TP aiguë évolue dans 80 % des cas vers un cavernome portal (réseau de collatérales porto-portes) responsable d'hypertension portale sévère et de splénomégalie. Les principales complications du cavernome portal sont la rupture de varices œsophagiennes, la récidive de thrombose ou plus rarement la cholangiopathie portale (compression de la voie biliaire principale par le cavernome avec ictère rétentionnel). Les patients atteints de NMP associée à une THS sont souvent jeunes avec une prédominance du sexe féminin. L'hémogramme est souvent normal ou avec des valeurs d'hématocrite ou de plaquettes en deçà des critères retenus pour évoquer un SMP. La mutation *JAK2V617F* fait partie du diagnostic étiologique devant toute THS quelles que soient les valeurs de l'hémogramme, si possible avec une BOM[96]. La BOM éventuellement couplée aux cultures de progéniteurs s'impose lorsqu'il n'a pas été mis en évidence d'autre étiologie à la THS. Les raisons de l'association entre SMP et THS ne sont pas connues.

4.2 Saignements

Chez les patients atteints de NMP, les hémorragies majeures (nécessitant une transfusion) sont principalement gastro-intestinales et les saignements mineurs (ne nécessitant pas de transfusion) sont représentés par des ecchymoses, des saignements du nez ou des gencives. Les incidents hémorragiques atteignent 0.8 épisodes pour 100 patients par an en ce qui concerne les saignements importants et 2.9 épisodes pour 100 patients par an, au total[107].

4.3 Myélofibrose

Les transitions vers la MF sont estimées à 5-14% dans la PV et 4-11% en ce qui concerne la TE[124]. Les facteurs de risque comprennent l'âge avancé, un nombre élevé de leucocytes[125] et une charge allélique *JAK2V617F* élevée, ainsi que les mutations additionnelles[126].

4.4 Leucémie aiguë myéloblastique

Les Leucémie Aiguës Myéloblastiques (LAM) sont définies par la transformation maligne d'un progéniteur hématopoïétique bloqué à un stade de différenciation et associé à une prolifération incontrôlée. Les évolutions leucémiques sont estimées à moins de 10 % dans la PV et 5 % dans la TE[126,127]. Les facteurs de risque associés à la transformation incluent l'âge avancé, la leucocytose et le caryotype anormal dans la PV[128] et l'âge avancé, la thrombose, la leucocytose, les mutations additionnelles et une morphologie pré-fibrotique à la BOM dans la TE[127].

5 Physiopathologie des Néoplasies Myéloprolifératives

5.1 Signalisation JAK2 dans la physiologie hématopoïétique

JAK2 est une tyrosine kinase cytosolique (Janus kinase 2). Les cytokines, telles que l'érythropoïétine (EPO), la thrombopoïétine (TPO), facteur de croissance hématopoïétique spécifique à la lignée des granulocytes (Granulocyte-Cell stem factor, G-CSF), les interleukines 3 et 5 et les interférons, utilisent JAK2 pour la transduction du signal[129]. Les récepteurs de l'EPO, de la TPO et du G-CSF ne sont pas associés à une activité tyrosine kinase, ils utilisent donc les protéines JAK pour la transduction du signal.

La liaison des cytokines au récepteur entraîne d'abord une dimérisation de celui-ci, puis une transphosphorylation de JAK2 et enfin une activation successive des cascades en aval (Figure 13).

La protéine JAK2 activée module la transcription de gènes cibles via les facteurs de transcription de la famille STAT (STAT5 en particulier), mais également par l'activation des mitogènes de la voie MAP kinase (MAPK/MEK/ERK) et celle de la phosphoinositide 3-kinase/sérine/thréonine kinase et Akt (PI3K/AKT). La signalisation JAK2 est essentielle dans l'hématopoïèse. La signalisation JAK2/STAT5 en réponse à l'EPO est cruciale dans les cellules myéloïdes. Les souris déficientes en EPOR[72], JAK2[129,130] ou STAT5[131] meurent pendant le développement embryonnaire dû à une érythropoïèse inefficace. La signalisation induite par la TPO au niveau du récepteur de la thrombopoïétine (MPL) utilise les voies JAK2/STAT5, JAK2/STAT3 et MAPK dans la mégacaryopoïèse[38,132].

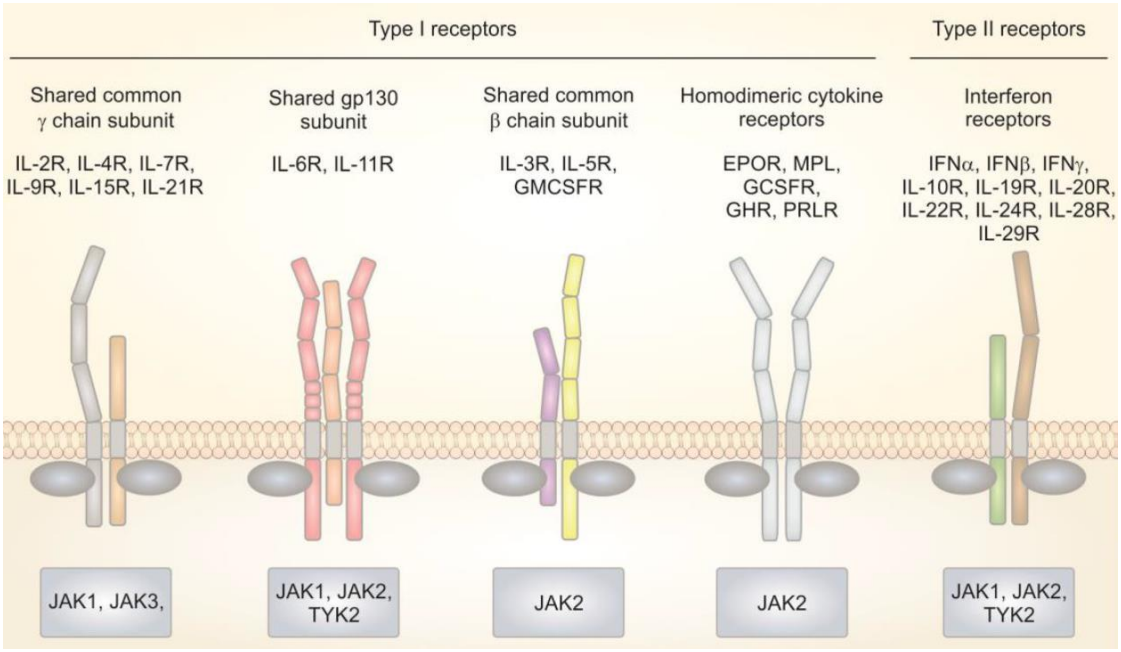


Figure 13 : Activation différentielle des JAK par les récepteurs de cytokines. Les kinases de la famille JAK s'associent différemment aux récepteurs des cytokines et sont activées lors de la liaison des cytokines aux récepteurs. Ce schéma montre les différentes familles et sous-groupes de récepteurs de cytokines et les JAK qui leur sont associés. IL : interleukine ; GMCSFR : récepteur du facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages ; EPOR : récepteur de l'érythropoïétine ; MPL - récepteur de la thrombopoïétine ; GCSFR - facteur de stimulation des colonies de granulocytes ; GHR - récepteur de l'hormone de croissance ; PRLR - récepteur de la prolactine ; IFN – interféron *(d'après Sangkhae et al, 2015).*

Les trois protéines homodimériques de type I, le récepteur de l'érythropoïétine (EPOR), le MPL/TPOR et le récepteur du facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSFR) emploient JAK2[133–135]. Cependant, le MPL/TPOR peut également activer TYK2, avec un faible signal de sortie[134,136] et le G-CSFR emploie JAK1[137]. L'EPOR active principalement STAT5, tandis que le MPL/TPOR et le G-CSFR activent fortement STAT3. MPL/TPOR induit également l'activation de STAT1[138]. MPL/TPOR et G-CSFR activent fortement la voie de la kinase 1/2 à régulation extracellulaire MAPK (ERK1/2), tandis que EPOR active cette voie à un degré moindre[135,139,140]. La perturbation du rapport physiologique entre STAT5 et STAT3 peut entraîner une leucémie, comme on le voit avec les troncatures du G-CSFR[141]. En

plus des récepteurs homodimériques, le GM-CSFR et l'IL-3 utilisent des récepteurs hétérodimériques qui contiennent la chaîne commune β, qui signale également via JAK2[142]. Bien que les membres de la famille IL-6 signalent principalement via JAK1, la gp130 et d'autres chaînes peuvent également activer JAK2[142].

5.2 Mutation initiatrices des NMP Phi-

Des mutations récurrentes ont été identifiées chez les patients NMP. Ces mutations acquises au niveau des CSH ont pour conséquence une prolifération anormale des différentes lignées myéloïdes. Elles sont dites initiatrices (« drivers ») car elles suffisent à reproduire le phénotype de la maladie *in vivo* chez la souris. Toutes ces mutations affectent les voies de signalisation et de manière prépondérante la voie JAK2/STAT5. Trois gènes sont ciblés par ces mutations : *JAK2*, *CALR* et *MPL*. Celles –ci sont associées à des fréquences différentes selon le type de NMP. La distribution des différents mutations initiatrices dans les NMP est décrite Figure 14.

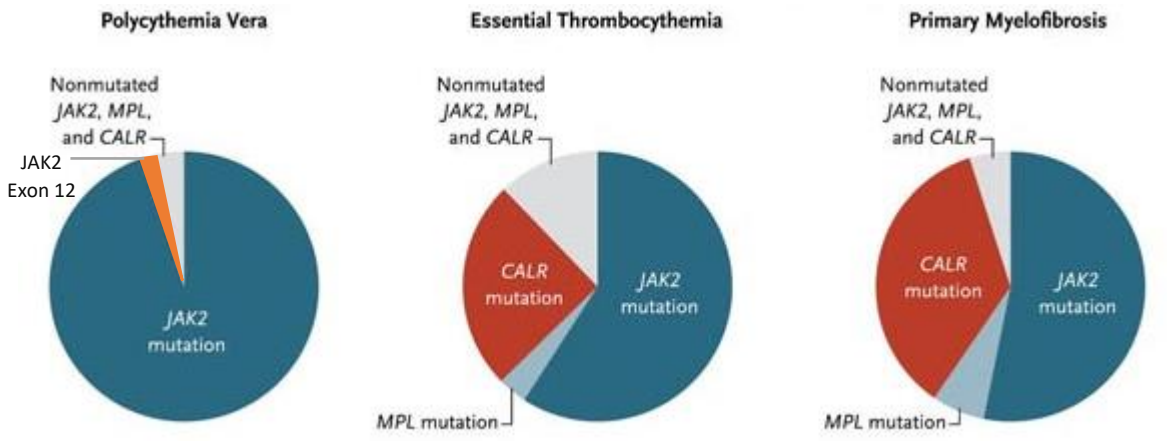


Figure 14 : Distribution des mutations JAK2, MPL et CALR dans les trois types de Néoplasies Myéloprolifératives (*d'après Klampfl et al, 2013)*.

5.2.1 JAK2

L'année 2005 a marqué un progrès majeur dans la compréhension de la pathogénie des NMP avec la découverte de la mutation *JAK2V617F* chez plus de 95 % des patients atteints de PV[101–104]. Les protéines JAK forment une famille de kinases particulières de par leur relation structure activité. Il existe en effet au sein de la protéine un domaine pseudokinase (JH2) permettant de réguler négativement le domaine kinase (JH1).

La mutation somatique acquise est située sur le chromosome 9p24 et touche le gène JAK2 dans l'exon 14. La substitution à la position 617 d'une valine par une phénylalanine affecte le domaine pseudokinase (domaine JH2), abolissant le rétrocontrôle négatif du JH2 sur JH1 (Figure 15) et entraînant une signalisation JAK2 constitutivement active (Figure 16). Même si les mécanismes moléculaires par lesquels V617F conduit à l'activation constitutive de JAK2 restent à déterminer, il existe de multiples hypothèses. Il est suggéré que le JH2 muté sert de médiateur pour la dimérisation de JAK2, facilitant la transphosphorylation du JH1[143]. En outre, le V617F dans JH2 déstabilise

l'interaction autoinhibitrice JH2-JH1[144–146]. La mutation V617F est proche du « linker » SH2-JH2 et un déplacement de celui-ci diminue la stabilité de l'interaction autoinhibitrice JH2-JH1[147]. Une petite fraction des patients PV négatifs pour le *JAK2V617F* présentent des mutations dans l'exon 12 de JAK2, perturbant ainsi la région de liaison entre le domaine SH2 et le domaine JH2 (SH2-JH2)[148] (Figure 15).

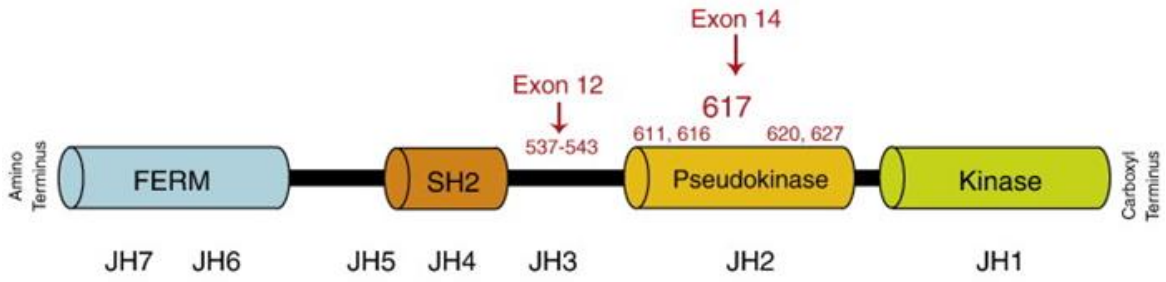


Figure 15 : Structure et domaines de JAK2. La mutation ponctuelle V617F est située dans le domaine pseudokinase JH2. Les mutations par insertion ou délétion nucléotidiques dans l'Exon 12 affectent la région de liaison SH2-JH2. Le domaine FERM est impliqué dans l'interaction avec les récepteurs. Le domaine SH2 aide la tyrosine kinase à interagir avec d'autres protéines. JH2 est un domaine pseudokinase qui régule négativement le domaine kinase adjacent (JH1). JAK2, Janus kinase 2 ; JH1, JAK homology 1 ; JH2, JAK homology 2 ; N, N terminus ; SH2, Src homology 2 (*Smith et al, Human Pathology, 2008*)

La suractivation du domaine kinase entraine ainsi non seulement une activation constitutive de la voie JAK-STAT, mais également des voies PI3K-Akt-mTOR et Ras-Raf-Mek-Erk, stimulant ainsi la transcription de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire (Bcl-Xl, Pim1, Cycline D1…)(Figure 16).

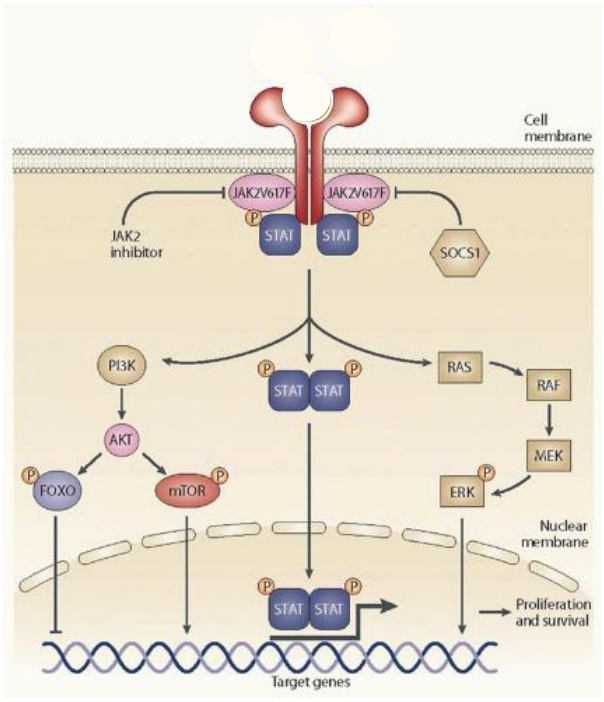


Figure 16 : Modèle d'activation de la voie JAK-STAT dépendante et indépendante des cytokines dans le cas de la mutation *JAK2V617F*. L'activation constitutive de la voie JAK/STAT a comme répercussion l'activation de signalisations physiquement et fonctionnellement proches telles que la voie PI3K-Akt-mTOR et MAP Kinase (*Quintas-Cardama et al, Nat Drug Disc, 2011*)

5.2.2 *JAK2V617F* : 1 même mutation, 3 phénotypes

Une question importante est de savoir comment une même mutation contribue au développement de phénotypes cliniques distincts dans les NMP (PV, TE et MF). Trois explications permettent de mieux appréhender cette question.

5.2.2.1 La charge allélique *JAK2V617F*

La perte d'hétérozygotie 9p24 (9pLOH) englobant le locus JAK2 est une caractéristique commune dans les NMP[149]. Contrairement aux gènes suppresseurs de tumeurs, dans lesquels la LOH est généralement le résultat d'une délétion hémigygote de la copie de type sauvage restante du gène, la 9pLOH dans les NMP est le résultat d'une disomie uniparentale générant 2 copies paternelles ou 2 copies maternelles de cette région après recombinaison mitotique. Cette anomalie cytogénétique conduit à ce que certaines cellules abritent 2 copies de la mutation *JAK2V617F*. En effet, un schéma de séquençage "homozygote" (>50% de charge allélique *JAK2V617F*) dans l'ADN des granulocytes est observé chez plus de 25% des patients PV et MF[101,104]. Bien que la recombinaison mitotique produise théoriquement une cellule avec 2 copies de JAK2 de type sauvage, ce clone n'a jamais été signalé chez les patients, ce qui suggère qu'il ne présente pas d'avantage sélectif suffisant pour la croissance clonale[150].

Il est frappant de constater que l'homozygotie de *JAK2V617F* détectée dans le compartiment granulocytaire est un phénomène beaucoup plus répandu dans la PV que dans la TE[104]. Dans la PV, l'homozygotie de *JAK2V617F* est associée à un taux d'hémoglobine plus élevé, à une numération leucocytaire plus importante, à une diminution des plaquettes, à une splénomégalie plus importante et à un besoin plus important de cytoréduction. Ces associations sont présentes indépendamment du fait que la mutation *JAK2V617F* soit considérée comme une variable discrète ("hétérozygote" par opposition à "homozygote") ou comme une variable continue (quantification de la charge d'allèle par qPCR)[151,152]. Cela a conduit à l'hypothèse que la *JAK2V617F* homozygote est à l'origine d'un phénotype érythroïde. Cette hypothèse est conforme aux études murines qui montrent que de faibles niveaux de *JAK2V617F* provoquent une thrombocytose avec une légère élévation de l'hématocrite, un phénotype rappelant celui observé chez les patients atteints de TE, alors que des niveaux plus élevés de *JAK2V617F* provoquent une érythrocytose et une leucocytose marquées sans thrombocytose associée[153]. De plus, les mutations de l'exon 12 de JAK2, capables d'induire une activation plus robuste des STAT en aval, ne sont observées que chez les patients atteints de PV et non de TE[148]. Il est donc probable que les différences de signalisation entre les cellules hétérozygotes et homozygotes de *JAK2V617F* contribuent à la variabilité phénotypique dans les NMP.

5.2.2.2 Conséquences de la signalisation différentielle de *JAK2V617F* dans les PV, TE et MF

Il est peu probable que l'intensité de la signalisation de JAK2 explique tout, car de nombreux patients PV ont une charge allèle V617F relativement faible. En conséquence, de nombreuses études ont suggéré qu'il existe des différences qualitatives en aval de *JAK2V617F*, en fonction de la maladie. L'analyse des signatures d'expression génique d'échantillons normaux et hétérozygotes *JAK2V617F* appariés a révélé des modifications cellulaires intrinsèques communes à la PV et à la TE ou uniques à l'une ou l'autre maladie. Cette analyse a révélé que l'activation STAT5 est omniprésente dans les deux sous-types de la maladie, alors que l'activation STAT1 est nettement plus prononcée dans les cellules mutantes des patients atteints de TE par rapport à celles des patients atteints de PV[154]. Il a été

démontré qu'une activité STAT1 accrue favorise la mégacaryopoïèse et limite l'érythropoïèse des cellules CD34+ dérivées de sang de cordon, une découverte qui peut expliquer en partie les différences phénotypiques de certains sous-types de NMP[155]. Conformément à cette idée, l'activité STAT1 atténuée produit un phénotype plus érythroïde dans les progéniteurs *JAK2V617F* positifs dérivés de patients atteints de TE[154] et dans un modèle murin *JAK2V617F* de NMP[156]. D'autres différences qualitatives dans la signalisation en aval de JAK2 mutant ont été signalées dans les tissus hématopoïétiques non triés. L'analyse de cellules CD34+ prélevées chez des patients atteints de PV, de TE et de MF pour un panel de voies de signalisation en aval de *JAK2V617F* par cytométrie de flux intracellulaire a révélé une phosphorylation STAT3 et STAT5 (mais pas ERK) plus élevée chez les patients MF par rapport aux patients PV et TE[157] , et l'analyse immunohistochimique de biopsies ostéo-médullaires de plus de 100 NMP révèle des marquages STAT3/5 différents dans des sous-types de NMP distincts, STAT3/5 étant plus élevé dans les PV que dans les TE[158].

5.2.2.3 Rôle des modificateurs génétiques constitutionnels dans le phénotype NMP

La diversité phénotypique des NMP pourrait également refléter des différences dans les modificateurs génétiques constitutionnels. Une étude limitée de 32 polymorphismes nucléotidiques (SNP)uniques dans une cohorte de 179 patients a révélé des associations spécifiques à la maladie avec plusieurs polymorphismes nucléotidiques uniques dans *JAK2* [159] et *EPOR*[160]. Plus tard, des polymorphismes touchant d'autres gènes ont été signalés (*MECOM, TERT, HSBL1-MYB*) [161]. Conformément à un rôle modificateur de la variation génétique de l'hôte dans le phénotype de la maladie, une charge d'allèle *JAK2V617F* significativement plus faible a été signalée chez les femmes atteintes de NMP par rapport aux hommes, ce qui suggère un rôle du sexe dans l'influence du taux de perte d'hétérozygotie et/ou de l'étendue de l'expansion clonale[162]. En outre, on observe un plus grand nombre de colonies homozygotes chez les hommes atteints de PV et chez les femmes atteintes de TE, ce qui suggère que le sexe peut également moduler les conséquences phénotypiques de l'homozygotie[163].

Ces études finales mettent en évidence un concept potentiellement important, à savoir que les 3 variables de la présentation de la maladie (nombre de copies de *JAK2V617F*, différences qualitatives de signalisation et modificateurs génétiques constitutionnels) ne s'excluent pas mutuellement, mais sont plutôt susceptibles d'être fortement interdépendantes.

5.2.3 La Calréticuline

La Calréticuline (CALR) est une protéine chaperonne et une protéine de liaison au Ca^{2+} située principalement dans le réticulum endoplasmique (RE)[164]. En outre, CALR a été liée à des fonctions extracellulaires, ce qui suggère un rôle immunomodulateur[165,166].

En 2013 des mutations situées dans l'exon 9 du gène *CALR* (localisé sur le chromosome 19) ont été mises en évidence chez les patients TE et MF. Un grand nombre de mutations différentes ont été identifiées, toutes modifiant l'extrêmité C-ter de la protéine et générant ainsi une nouvelle séquence [167,168]. Deux mutations sont cependant plus fréquentes que les autres : la délétion de 52 paires de bases (pb) (type 1) et l'insertion de 5 pb (type 2) est présente respectivement chez 53% et 32% des patients atteints de TE et négatifs pour *JAK2V617F*[167]. Les autres mutations de *CALR* sont moins fréquentes et sont souvent patient-spécifiques[167,169]. Toutes les mutations de *CALR* entraînent une absence de signal de rétention de la protéine (signal C-ter KDEL) dans le RE[167,170].

Il a été noté que tous les patients NMP présentant des mutations de *CALR* ont un profil d'expression génique spécifique d'activation des voies de signalisation JAK2[171]. En effet, les mutants CALR activent

le récepteur de la thrombopoïétine (MPL), ce qui entraîne une activation constitutive de JAK2[172–175]. Cette activation est notamment consécutive à la liaison du domaine C-terminal hautement chargé positivement des mutants CALR au domaine extracellulaire de MPL chargé négativement qui conduit à sa dimérisation et donc à son activation même en l'absence de son ligand, la TPO[174]. (Figure 17).

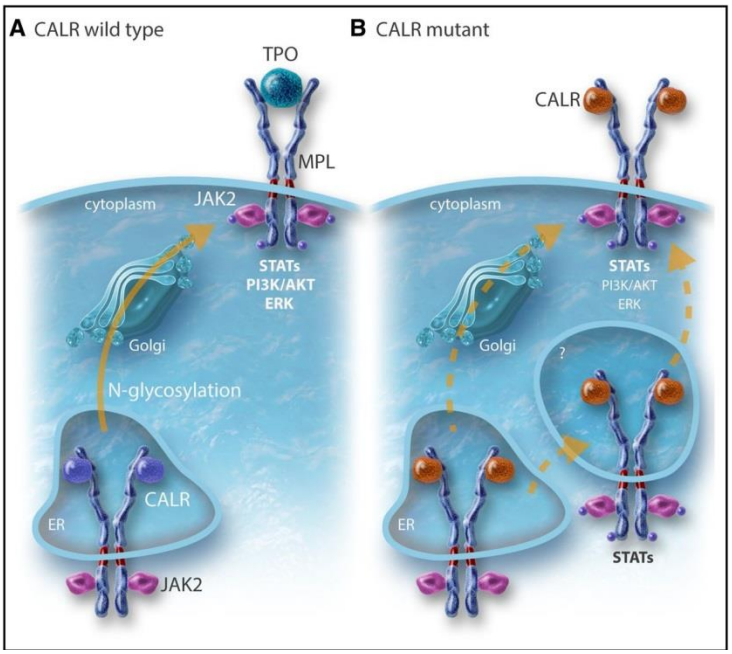


Figure 17 : Modèle d'activation de la voie JAK-STAT dans le cas de mutations de la Calréticuline. (A) La calréticuline non mutée se détache du récepteur MPL avant l'enchâssement de celui-ci à la membrane plasmique. (B) La calréticuline mutée reste fixée au récepteur MPL après sa migration à la surface cellulaire et l'active constitutivement. CALR : Calréticuline, ER : Endoplasmic Reticulum (*Vainchenker et al, Blood, 2017*)

5.2.4 MPL

Le gène *MPL*, localisé sur le chromosome 1, code pour le récepteur de la thrombopoïétine qui est impliqué dans la mégacaryopoïèse via la signalisation JAK2 en aval de celui-ci. Les mutations MPL*W515K* et MPL*W515L* (les plus fréquentes) affectent l'exon 10[176,177] et touchent le domaine juxtamembranaire de la protéine. D'autres mutations moins fréquentes (S204P et Y591N/D)[178,179] sont reportées. Il a été montré que non seulement les mutations les plus fréquentes (W515K/L, S505A) mais également les plus rares activent en absence de ligand (TPO) une signalisation JAK2/STAT5 en aval du récepteur[178] (Figure 18).

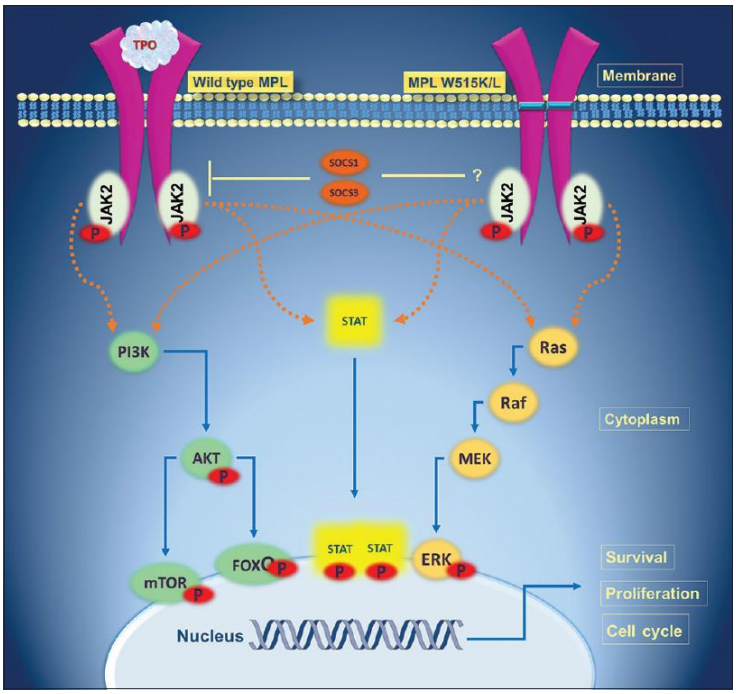


Figure 18 : Modèle d'activation de la voie JAK-STAT en aval de l'activation du récepteur MPL, dépendante ou indépendante des cytokines dans le cas de mutations activatrices de MPL touchant le domaine juxtamembranaire (MPL W515K/L) (*Kavianpour et al, Clin Cancer Invest J, 2017*).

5.3 Mutations initiatrices et modèles animaux

Afin de déterminer s'ils sont à l'origine du développement d'une NMP et de modéliser la maladie, les trois types de mutations NMP ont été exprimées chez la souris. *JAK2V617F* a été exprimé dans l'hématopoïèse des souris par plusieurs approches : transduction rétrovirale de CSH suivie d'une greffe de moelle osseuse, souris transgéniques et souris knock-in (KI) constitutive ou inductible. Quel que soit le modèle, l'expression de *JAK2V617F* induit un phénotype myéloprolifératif avec certaines différences. Le phénotype le plus fréquent est celui d'une PV progressant vers la MF[180,181]. Une corrélation entre le niveau d'expression et le phénotype a été trouvée : une faible expression étant associée à un phénotype de type TE et une expression plus élevée à un phénotype de type PV[153].

Une variabilité phénotypique supplémentaire peut être liée à l'utilisation d'un gène *JAK2V617F* humain par rapport au murin. Le Knock-In (KI) hétérozygote du *JAK2V617F* humain présente un phénotype de type TE très léger et le KI homozygote induit une érythrocytose[182]. Ainsi, dans les modèles murins, *Jak2v617f* est initiateur de la maladie myéloprolifératives et le niveau d'expression détermine en grande partie le phénotype, une situation proche de la pathologie humaine. Récemment, la génération de souris transgéniques *Jak2* mutées dans l'exon 12 montrent le développement d'une érythrocytose isolée[183]. Le phénotype érythroïde était encore plus marqué que chez les souris transgéniques *JAK2V617F*. Cela a été attribué à des changements importants dans le métabolisme du fer, notamment une diminution de l'expression de l'hepcidine et une augmentation de l'expression du récepteur-1 de la transferrine et de l'érythroferrone qui favorisent la disponibilité du fer pour les érythroblastes.

Pour les mutations *MPLW515K/L/A*, seuls les modèles rétroviraux ont été décrits. Bien que ces modèles soient loin d'être idéaux car ils conduisent à l'expression du mutant *MPLW515* dans tous les types de cellules hématopoïétiques, on observe généralement un trouble de type TE progressant rapidement vers la MF, un phénotype proche des souris exprimant un niveau élevé de TPO[177].

Pour les mutants *CALR*, des modèles rétroviraux ont été utilisés pour induire une maladie myéloprolifératives rappelant un phénotype de type TE, qui dans le cas de *CALRdel52* peut évoluer vers la MF. Dans ce modèle de souris, la présence de MPL est indispensable au développement de la maladie[174,175]. Un modèle transgénique récent pour *CALRdel52* conduit également à un phénotype de type TE qui a été amélioré par le ruxolitinib, des résultats similaires ayant été obtenus chez les souris KI *del61* ou *del52 (Balligand et al, ASH, 2016)*.

5.4 Physiopathologie cellulaire des NMPs

En résumé, les données actuelles soutiennent l'hypothèse selon laquelle le phénotype des NMP est principalement lié aux types de récepteurs qui sont activés. Dans tous les modèles décrits à ce jour, l'activation de MPL joue un rôle central par son action sur les CSH et sur les mégacaryocytes[175,177,184]. L'hyperplasie des mégacaryocytes joue un rôle central dans la pathogenèse des NMP non seulement en augmentant la production de plaquettes, mais aussi en servant de niche pour les CSH, en remodelant la moelle osseuse conduisant à la MF et aussi en induisant une néo-ostéogenèse. Les différents STAT peuvent jouer un rôle important dans le phénotype de la maladie : STAT5 étant nécessaire pour le développement de la PV, STAT3 inhibant la thrombocytose et STAT1 augmentant la thrombocytose (Figure 19)[185,186].

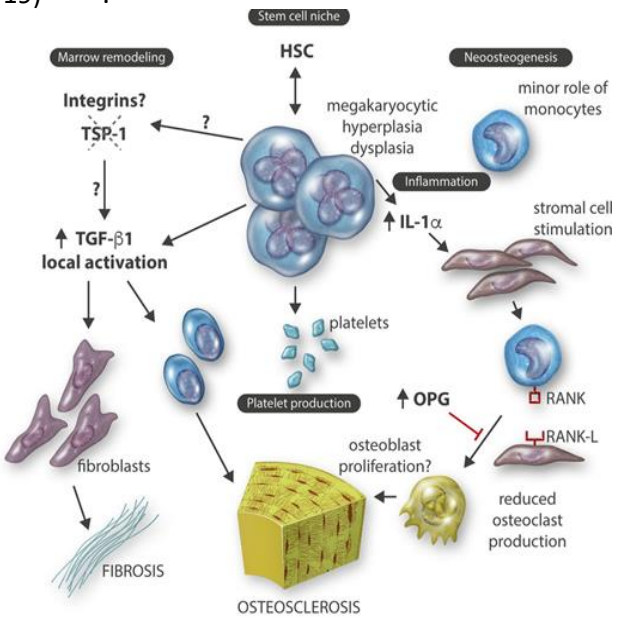


Figure 19 : Rôle central des mégacaryocytes dans la physiopathologie des Néoplasies Myéloprolifératives. L'interaction des mégacaryocytes tumoraux avec les autres cellules de la niche hématopoïétique contribue à la croissance des fibroblastes et ostéoblastes favorisant l'évolution vers la fibrose et l'ostéosclérose médullaire (*d'après Vainchenker et al, Blood, 2017*).

5.5 Corrélations clinico-biologiques liées aux mutations initiatrices dans les NMP

5.5.1 JAK2 dans les PV

Parce qu'environ 95% des patients PV ont des mutations *JAK2V617F* et 4% ont des mutations *JAK2* exon 12, les comparaisons entre les patients *JAK2* positifs et négatifs ne sont pas vraiment possibles. La présence de mutations CALR chez deux cas de PV négatifs pour *JAK2V617F* a été signalée, mais cela semble être une circonstance exceptionnelle[187]. Bien que ceux qui présentent des mutations de l'exon 12 de *JAK2* puissent avoir un taux d'hémoglobine (Hb) plus élevé et un nombre de plaquettes et de leucocytes plus faible que ceux qui présentent des mutations *JAK2V617F*, les évolutions cliniques ne diffèrent pas, étant donné les incidences similaires de thrombose, de MF, de LAM et de décès[188]. Cependant, des associations entre la charge allélique *JAK2V617F*, le phénotype clinique et l'évolution de la maladie chez les patients atteints de PV ont été signalées. En particulier, la charge allélique élevée a été associée à l'âge avancé, au sexe masculin, au prurit et à la splénomégalie. Des associations entre une charge allélique en augmentation et la thrombose (artérielle et veineuse), ainsi que la transformation de la MF ont également été suggérées[121,126,163,189–191].

Une autre association phénotypique bien connue avec *JAK2V617F* est la Thrombose Hépato-Splanchnique (THS), mais les patients atteints présentent une exception en ce qui concerne le phénotype clinique et la charge allélique puisque cette complication est souvent observée chez des femmes plus jeunes, avec soit un phénotype masqué, soit une numération leucocytaire et une charge allélique plus faibles[192,193]. Les mutations impliquant *MPL*, l'exon 12 de *JAK2* et *CALR* sont rarement mises en cause par rapport à *JAK2V617F* chez les patients présentant une thrombose des veines splanchniques[192,194].

5.5.2 TE

Dans les descriptions initiales, il a été signalé que les patients atteints de TE mutées *CALR* présentaient un taux d'Hb et de leucocytes plus faible et un taux de plaquettes plus élevé au moment du diagnostic, par rapport à ceux qui présentaient la mutation *JAK2V617F*[167,168]. Bien qu'un taux plus élevé de MF secondaires ait été signalé chez les patients à mutation *CALR* par rapport aux patients à mutation *JAK2*, il n'y avait pas de différence dans les taux de survie par mutation[168]. Par la suite, de grandes séries ont

confirmé des taux de thrombose plus faibles chez les patients mutés *CALR* par rapport à ceux mutés *JAK2* ; il est intéressant de noter qu'aucun patient muté *CALR* n'a évolué vers la PV, alors que le risque à 10 ans était proche de 30% chez ceux mutés *JAK2*[169,195].

Malgré les rapports constants faisant état d'un taux de thrombose plus faible chez les patients atteints de TE mutées, il semble peu utile d'incorporer *CALR* dans le score pronostique international de la thrombose dans les TE (IPSET), qui accorde du poids à la présence de la mutation *JAK2V617F*[196]. Une explication possible est la co-ségrégation des mutations *CALR* avec d'autres caractéristiques de risque thrombotique plus faible, telles que le jeune âge et des antécédents de thrombose moins fréquents, qui sont déjà incorporées dans le score pronostique[197].

5.5.3 Myélofibroses

Les premières descriptions des mutations *CALR* ont suggéré que les délétions de type 1 étaient plus fréquentes dans les MF par rapport aux TE. De plus, comme dans la TE, les patients MF présentant des mutations *CALR* présentaient également un nombre de leucocytes plus faible et un nombre de plaquettes plus élevé par rapport à ceux qui présentaient une MF avec une mutation *JAK2*[167]. Une survie globale plus longue a également été notée dans cette étude initiale pour ceux qui présentaient une MF *CALR*-positive, par rapport à ceux qui présentaient une mutation *JAK2* ou *MPL*[167].

Dans une étude portant sur 620 patients environ, 65% étaient porteurs de la mutation *JAK2V617F*, 23% présentaient des mutations *CALR*, 4 % des mutations *MPL* et 8% un profil dit Triple Négatif (TN)[198]. A la présentation, les patients *CALR* mutés étaient plus jeunes, avec un nombre de leucocytes plus faible, un nombre de plaquettes plus élevé et des groupes à risque plus faible. Les patients TN étaient plus âgés, avec un taux d'hémoglobine (Hb) plus faible, un nombre de plaquettes plus faible et des groupes à risque plus élevé. Au cours du suivi, les patients mutés *CALR* présentaient une incidence cumulative plus faible d'anémie (Hb <10 g/dL), de thrombocytopénie (<100 × 10^9/L) et de leucocytose marquée (>25 × 10^9/L).[198]. Les taux de thrombose étaient plus faibles dans les groupes présentant des mutations CALR (13%) que dans ceux présentant des mutations *JAK2V617F* (18%). L'incidence cumulée sur 10 ans de la transformation blastique était la plus élevée chez les patients TN (34%), par rapport à ceux présentant des mutations *JAK2V617F* (19%), *MPL* (16%) et *CALR* (9%). Le profil mutationnel avait également un impact indépendant sur la survie globale médiane, qui était de 18 ans pour les patients mutés *CALR*, 9 ans pour les patients mutés *JAK2V617F*, 9 ans pour les patients mutés *MPL* et 3 ans pour les patients TN. Après ajustement en fonction de l'âge, les patients mutés *CALR* ont encore une meilleure survie globale que ceux qui ont des mutations *JAK2* ou des MF TN[115,198–200].

Il est intéressant de noter que le profil mutationnel a moins d'impact sur le pronostic chez ceux qui présentent une MF secondaire par rapport aux MFP, selon une étude portant sur 359 patients présentant une MF post-PV (n = 194) et une MF post-TE (n = 165)[191].

5.6 Mutations additionnelles dans les NMP

Outre *JAK2*, *CALR* et *MPL* qui sont généralement exclusives les unes des autres, un certain nombre d'autres mutations viennent se surajouter aux mutations initiatrices chez les patients atteints de NMP (Figure 20). Les protéines affectées sont impliquées dans les voies de signalisation, notamment NRAS, KRAS, NF1 et CBL[201,202], la méthylation de l'ADN (TET2, DNMT3A, IDH1/2)[203–205], le remodelage de la

chromatine (EZH2 et ASXL1)[206,207] et l'épissage des ARNm (SF3B1, SRSF2 et U2AF1)[208–210]. Des gènes associés à la transformation sont également mutés dans une proportion non négligeable de cas (*TP53*).

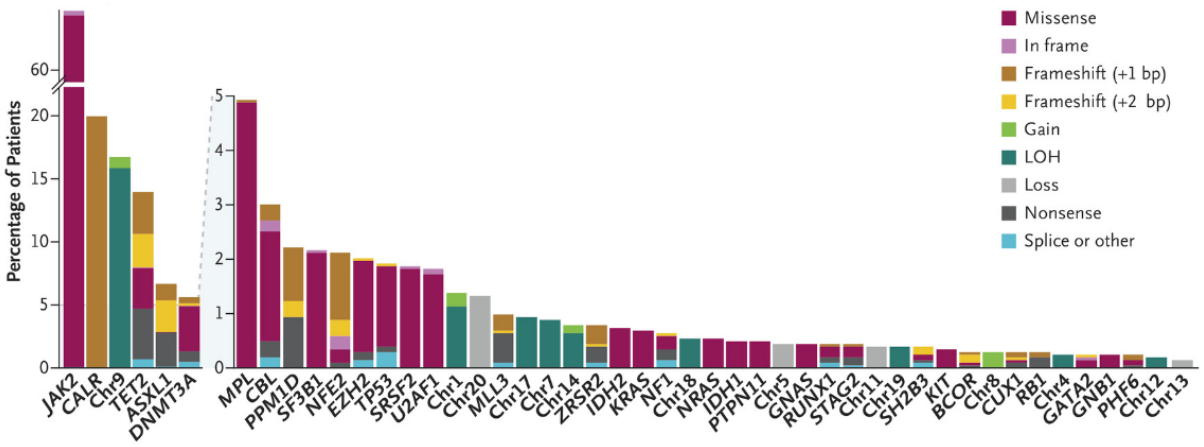


Figure 20 : Paysage mutationnel et fréquence des mutations additionnellles dans les Néoplasies Myéloprolifératives. Les mutations ont été stratifiées selon leur type (faux-sens, non-sens, affectant un site d'épissage, ou autre [par exemple, arrêt, gain ou perte]). Les insertions et les suppressions (del) ont été classées selon qu'elles entraînent un décalage du cadre de lecture du codon (de 1 ou 2 paires de base [bp]) ou qu'elles sont dans le cadre. Les chromosomes sont indiqués par Chr plus un chiffre (par exemple, Chr9 désigne le chromosome 9). Les gains chromosomiques comprennent les gains de chromosomes entiers (trisomie) et les amplifications intra-chromosomiques. Les pertes chromosomiques comprennent les délétions du chromosome entier (monosomie) et les délétions intra-chromosomiques (*d'après Grinfeld et al, 2018*).

5.6.1 Pronostic dans les PV et TE

Le séquençage complet des exons de 48 échantillons de PV et de 62 échantillons de TE a permis d'identifier une médiane de 6,5 mutations par patient dans chaque groupe (contre 13 dans les MF)[168]. Bien que de fréquence faible dans les PV, les gènes non initiateurs les plus souvent mutés comprenaient *TET2*, suivi de *DNMT3A*. Dans les TE, les mutations additionnelles touchaient le plus souvent *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*[168]. Il est intéressant de noter que l'ordre dans lequel les mutations sont acquises semble influencer les caractéristiques cliniques. Par le génotypage de colonies hématopoïétiques et l'utilisation de NGS, il a été suggéré que les patients qui ont acquis la mutation *JAK2V617F* avant *TET2* étaient plus jeunes, plus susceptibles de présenter une PV qu'une TE, et avaient des taux de thrombose plus élevés par rapport aux patients qui ont acquis des mutations de *TET2* avant *JAK2V617F*[211].

Récemment, la prévalence et le pronostic des mutations additionnelles ont été signalés dans une autre cohorte, comprenant une centaine de patients PV et TE[212]. Dans les PV, 44% ont été signalés comme ayant des mutations additionnelles, dont 29% présentant 1 mutation, 14% 2 mutations, et 1% 3 mutations. Les mutations les plus courantes concernaient *TET2* (18 %), *ASXL1* (11 %), *SH2B3* (5 %) et *SF3B1* (3 %). Le nombre de mutations a un impact sur la survie globale et la survie sans MF. Dans une analyse multivariée, *SRSF2* et *RUNX1* affectent la survie globale, la présence d'*IDH2* et *RUNX1* diminue la survie sans leucémie, et *ASXL1*, *IDH2*, *RUNX1*, *KIT* et *SETBP1* favorisent la progression de la fibrose[212].

Dans les TE, 46 % des patients présentaient des mutations additionnelles. Les mutations les plus courantes concernaient *TET2* (13 %), *ASXL1* (11 %), *DNMT3A* (6 %), *SF3B1* (5 %), *CEBPA* (4 %), et *TP53*, *SH2B3*, et *CSF3R* (2 % chacun). Le nombre de mutations avait un impact sur la survie globale, mais pas sur la transformation en leucémie ou la survie sans MF[213]. En analyse multivariée, les mutations *EZH2* et *SF3B1* avaient un impact péjoratif sur la survie[212].

5.6.2 Pronostic dans les MF

Pour clarifier la pertinence du pronostic des mutations additionnelles et leur impact sur la survie, une collaboration internationale a analysé les résultats d'environ 850 patients atteints de MFP et dont le statut mutationnel était connu[214]. Les mutations *ASXL1* étaient corrélées avec les symptômes, la leucocytose et la présence de blastes circulants. Les mutations *SRSF2* étaient corrélées avec l'âge et les mutations *EZH2* associées à la présence de blastes circulants. Les patients présentant des mutations *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* ou *IDH1/2* étaient exposés à un risque de décès prématuré ou de transformation leucémique.

Les patients présentant l'une de ces mutations ont un profil de "risque moléculaire élevé" (HMR). Cependant, seules les mutations *ASXL1* restaient significativement associées à la survie dans le contexte de l'IPSS (Score International Pronostique)[214]. Il a été démontré par la suite que le nombre de mutations est également important, car la présence de 2 mutations ou plus est péjorative. En effet, la survie médiane rapportée est de 12 ans pour les patients sans mutation contre 2 ans et demi pour ceux avec 2 mutations ou plus[215].

Une autre étude dépistant les mutations de plus de 100 gènes par NGS au moment du diagnostic et pendant le suivi a démontré la présence de mutations somatiques chez 90 % des patients, et 40% étaient porteurs de mutations autres que *JAK2V617F* ou *CALR*. Ici encore, la présence de mutations somatiques ≥ 2 réduisait de manière significative la survie globale et augmentait le risque de transformation en LAM. Les mutations somatiques de *TP53* avec perte d'hétérozygotie étaient fortement associées à la transformation leucémique[216].

L'impact du profil mutationnel sur le pronostic a également été signalé[217]. Parmi 570 patients, ceux ayant le profil mutationnel *CALR*-positif/*ASXL1*-négatif avaient une survie médiane de 10 ans et demi, les patients ayant le profil mutationnel *CALR*-positif/*ASXL1*-positif ou *CALR*-négatif/*ASXL1*-négatif avaient une survie médiane de 5,8 ans, et les patients *CALR*-négatif/*ASXL1*-positif avaient une survie médiane de 2,3 ans[217]. Dans ce cadre, de nouveaux systèmes de notation du pronostic intégrant les caractéristiques moléculaires et génétiques de la MF ont été proposés (MIPSS70, GIPSS)[218,219].

Comme mentionné précédemment, l'impact du profil mutationnel diffère chez les malades ayant une MF secondaire (MF post-TE et MF post-PV)[191]. Les MF post-TE sont plus susceptibles de présenter des mutations *ASXL1* et *EZH2* que celles ayant subi une MF post-PV. Cependant, dans les cas de MF post-PV, il n'y avait pas d'association avec une mutation en particulier, un profil moléculaire de haut risque (HMR) ou le nombre de mutations HMR et la survie globale. Dans les MF post-TE, seul le statut muté *SRSF2* était corrélé avec une survie réduite (5 ans contre 14 ans et demi, muté contre sauvage).

Toutes ces mutations pronostiques ont permis à l'équipe de Campbell de réaliser une classification personnalisée en fonction de nombreux paramètres dont le type de mutation et le nombre. On peut ainsi prédire de manière précise la survie des malades pour chaque cas de NMP en fonction du stade de la maladie[220], traduisant l'importance de la détection et de la stratification des NMP.

5.7 Cas des NMP triples négatifs

L'implication évidente des mutations dans la pathologie des NMP a rapidement suscité le besoin de rechercher ces mutations récurrentes au diagnostic, mais également d'étendre la recherche de mutations éventuelles aux gènes initiateurs entiers, dans l'espoir d'expliquer des formes cliniques de NMP dites TN ou des formes familiales particulières. Deux équipes se sont intéressées au séquençage d'exome dans des échantillons de malades atteints de NMP TN (essentiellement TE mais également MF) ou des formes familiales[178,179]. Ces études ont permis de mettre en évidence des mutations somatiques ou germinales essentiellement dans *MPL* (*T119I, S204P, S204F, E230G, V285E, Y591D et R321W, S505N, W515R, Y591N*) mais également dans *JAK2* (*G571S, F556V, V625F*). Les mutations décrites ont, pour les rares étudiées, été associées à un gain de fonction, suggérant un rôle dans la physiopathologie et le phénotype de NMP observé.

D'autres part des mutations dans ces gènes peuvent survenir seules ou en sus des mutations récurrentes connues comme responsables de la pathologie[221–223]. Ces mutations sont en général peu ou non rapportées, et leur fonctionnalité peu connue dans la pathogenèse de la maladie myéloproliférative. Ces entités, bien que rares justifient donc la couverture par séquençage de la séquence entière des gènes initiateurs de la maladie.

6 Traitements

Les thérapies actuelles des NMP réduisent les complications thrombohémorragiques, mais ne permettent pas la guérison des patients. Les patients à faible risque thrombotique sont traités par phlébotomie et aspirine alors que les patients présentant des scores de risque pronostique élevés sont traités par des thérapies cytoréductrices telles que l'hydroxyurée (HU), l'interféron alpha (IFN) ou le ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1/JAK2.

6.1 Phlébotomie

La phlébotomie (saignées), qui vise à diminuer le nombre et le volume total des cellules sanguines, est utilisée pour traiter la PV depuis plus de 50 ans[224]. La phlébotomie reste le traitement de choix chez les patients PV de faible risque. La réduction de l'hématocrite en dessous de 45% diminue les taux d'événements thrombotiques[118].

6.2 Aspirine

L'aspirine réduit la production de Thromboxane A2 (TxA2), diminuant ainsi l'aggrégation plaquettaire[225]. Le médicament inactive la cyclooxygénase, une enzyme nécessaire à la synthèse du TxA2 dans les plaquettes[226]. Il est important de noter que le TxA2 est augmenté chez les patients atteints de PV[227] . Des études cliniques ont montré l'efficacité de l'aspirine à faible dose dans les PV[228]et TE[229]. Néanmoins, l'administration de l'aspirine peut entraîner des complications hémorragiques.

6.3 Anagrélide

Au départ employé comme anticoagulant, l'anagrélide entraîne une activité intense et spécifique de réduction des plaquettes, dont il diminue la production en inhibant le développement des colonies de

mégacaryocytes[230]. C'est un médicament oral utilisé principalement comme traitement de deuxième intention dans les cas de TE pour prévenir la thrombose et l'hémorragie, même si reste inférieur à l'hydroxyurée[231]. Il ne semble pas diminuer le risque d'évolution vers la fibrose et, vu ses propriétés anticoagulantes, il peut augmenter le risque d'hémorragie lorsqu'il est combiné à l'ASA. Ses effets secondaires les plus courants sont les céphalées et la tachycardie, mais ces effets se résorbent souvent après les premières semaines de traitement.

6.4 Hydroxyurée

L'hydroxyurée (HU) est le principal médicament utilisé dans la PV comme cytoréducteur au niveau médullaire[232,233]. L'HU inactive la ribonucléotide réductase, une enzyme qui catalyse la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides, bloquant la synthèse de l'ADN aboutissant à l'apoptose des cellules[234].

Le traitement par HU réduit l'incidence des événements thrombotiques[235]. Même si jusqu'à 90 % des patients le supportent bien, 24 % développent une résistance ou une intolérance, et notamment des effets secondaires cutanés qui peuvent être parfois invalidants[127,236]. La résistance augmente le risque de décès et les risques transformations en MF ou LAM sont respectivement multipliées par 5,6 et 6,8[236,237]. En outre, le traitement par HU a été associé à une augmentation de 10 % du risque leucémogène[232]. Néanmoins, une étude plus récente portant sur 3 460 patients n'a trouvé aucune preuves du lien entre le traitement par HU et risque leucémogène[238].

6.5 Interféron-α

6.5.1 Historique de l'utilisation dans les hémopathies myéloïdes : la LMC

L'intérêt initial pour l'étude de l'interféron alpha dans la LMC s'explique par les succès antérieurs de son utilisation dans le traitement d'autres affections malignes. L'observation que l'interféron provoquait une leucopénie lorsqu'il était administré à des patients cancéreux a conduit Verma et al. à étudier l'influence des préparations d'interféron leucocytaire humain sur la myélopoïèse in vitro. Un déclin de la formation de colonies myéloïdes avec des concentrations croissantes d'interféron, et un pourcentage croissant de progéniteurs granulocytaires immatures ont été notés. Les auteurs ont conclu que la leucopénie était due à un blocage de la différenciation des précurseurs myéloïdes de la moelle [239]. Des recherches ultérieures ont révélé que les cellules progénitrices granulocytaires (CFU-G) prélevées chez des patients atteints de LMC, ainsi que les témoins CFU-G normaux, étaient également inhibées par deux préparations d'interféron humain [240]. Ces résultats précliniques ont donné lieu à des essais cliniques ultérieurs sur l'utilisation de l'interféron alpha chez les patients atteints de LMC. À ce moment précis, la présence du chromosome dit de Philadelphie dans la LMC était connue, mais les implications moléculaires derrière cette altération cytogénétique restaient à découvrir.
Le groupe du M.D. Anderson Cancer Center a été le précurseur des essais cliniques sur l'interféron alpha, en étudiant initialement une forme partiellement purifiée dérivée de leucocytes humains. Dans une étude préliminaire portant sur sept patients atteints de LMC, une rémission hématologique a été observée chez cinq patients, et les auteurs ont noté que la dose nécessaire pour obtenir cette rémission était sensiblement plus élevée (9 millions U/jour) que celle utilisée dans le traitement d'autres affections malignes, ce qui suggère un effet de réponse proportionnelle à la dose dans la LMC[241].
En terme mécanistique, bien que l'interféron alpha existe depuis de nombreuses années, nous ne connaissons toujours pas les mécanismes par lesquels il déclenche son effet anti-leucémique dans la

LMC. On pense que l'interféron alpha a un effet inhibiteur direct sur la croissance et la prolifération des cellules[242], une influence sur la différenciation et l'apoptose des cellules[243], une augmentation du microenvironnement de la moelle osseuse, une modulation de l'expression des gènes[244] et une amélioration de la réponse immunomodulatrice[245–247]. Une réponse spécifique de la tumeur a même pu être mise en évidence[248,249]. Les premières utilisations de l'IFN dans les NMP classiques ont été proposées peu de temps ensuite compte tenu de ces résultats[250].

6.5.2 Efficacité clinique dans les NMP classiques

Dans la perspective de guérir les NMP, il est nécessaire de viser à éradiquer le clone malin. Les premières preuves d'une possible régression du phénotype de la maladie après traitement par IFN sont apparues lors d'études cliniques. Une première étude a permis d'identifier environ 400 cas de PV et de TE, respectivement, et 100 cas de MFP signalés lors d'essais cliniques utilisant l'IFN, avec plus de 10 patients inclus[251]. Dans pratiquement toutes les études de PV et de TE, l'IFN a permis de normaliser rapidement la numération plaquettaire et la leucocytose, et de réduire l'érythrocytose, ce qui a permis de réduire le besoin en saignées en quelques mois. Dans les deux maladies, une réponse hématologique objective a été observée chez environ 80 % des patients, y compris l'absence totale de phlébotomies dans la PV chez 60 % des patients[252,253]. En outre, un effet spécifique de l'IFN contre le clone de NMP a été suspecté dans des études occasionnelles montrant une réversion des schémas d'hématopoïèse monoclonaux à polyclonaux (à l'aide d'études d'inactivation du chromosome X et de régression d'anomalies cytogénétiques)[254–257].

6.5.3 Ciblage spécifique de clone : *JAK2V617F*

Deux études cliniques indépendantes de phase 2 du peg-interféron-α2a (peg-IFN) ayant évalué la charge allélique *JAK2V617F* pendant le traitement ont fourni de nouvelles preuves d'un effet ciblé contre le clone myéloprolifératif. Dans ces études, les taux de réponse hématologique ont atteint 79-100 %, avec des réponses complètes observées chez 54-95 % des patients[253,258]. Il est intéressant de noter que dans ces études sur le peg-IFN, le taux d'arrêt pendant la première année de traitement pour cause d'intolérance était très faible, <10 %, c'est-à-dire au moins égal, voire inférieur, à celui signalé dans les études prospectives avec un traitement classique comme l'HU[231,236,237,259]. Après des périodes de suivi médianes de 21 et 31 mois, une réponse moléculaire complète (*JAK2V617F* indétectable) a été obtenue par 14 % et 24 % des patients, respectivement. Plus récemment, une étude clinique de phase 2 utilisant une nouvelle forme de peg-IFN (α2b) chez des patients atteints de PV a rapporté un taux de réponse clinique et hématologique de 90% environ après 18 mois de traitement, environ la moitié des patients ayant obtenu une réponse complète[260,261]. Dans cette étude, 35% des patients ont obtenu une réponse moléculaire. Au total, ces trois études fournissent des preuves cohérentes de la capacité manifeste de l'IFN à réduire et, à terme, à éradiquer les cellules malignes porteuses de la mutation *JAK2V617F*, une propriété qui n'a jamais été démontrée dans une telle proportion avec aucun autre médicament à ce jour. De plus, et à la différence du traitement par HU, les patients chez qui on arrête l'IFN ne rechutent pas rapidement, que ce soit au niveau hématologique, ou même au niveau moléculaire (*Daltro de Oliveira et al, ASH, 2020*), argumentant ainsi un effet sur les cellules souches leucémiques (cf chapitre Activité sur les CSH). En outre, il faut garder à l'esprit que l'évaluation de la réponse moléculaire complète doit être interprétée en fonction de la sensibilité du test utilisé, qui n'est pas si élevée (environ 0,5-1%) pour la détection systématique de la mutation *JAK2V617F*[262].

6.5.4 Spécificité de clone plus générale

L'IFN n'est pas un inhibiteur spécifique de JAK et plusieurs études ont également signalé que les aberrations cytogénétiques pourraient également être éliminées après un traitement à l'IFN[254–257,261]. Ces résultats suggèrent que l'effet ciblé observé contre les cellules mutées *JAK2V617F* peut probablement être tout aussi efficace contre d'autres modifications génétiques associées au cancer. En effet, un avantage théorique de l'IFN par rapport aux inhibiteurs spécifiques d'une cible donnée est que, étant "non spécifique" de toute altération génétique, il peut avoir une certaine activité contre les clones de NMP, indépendamment de leurs défauts moléculaires sous-jacents. En effet, l'évolution des mutants *CALR* a été suivie dans une cohorte plus importante de patients atteints de TE et recevant uniquement de l'aspirine, ou de l'HU ou de l'IFN[263]. La charge allélique des mutants *CALR* ne changeait pas de manière significative au fil du temps chez les patients recevant uniquement de l'aspirine ou de l'HU. En revanche, la charge allélique médiane des mutants *CALR* diminuait de manière significative de 50 à 26% dans le groupe de patients traités par IFN, avec une réponse moléculaire complète dans 6% des cas, et la diminution de plus de 50% dans environ 40% des cas. Cette réponse moléculaire a été associée à une efficacité clinique claire, puisque les 31 patients étudiés ont tous obtenu une réponse hématologique selon les critères de l'European Leukemia Net[264], dont 77 % de réponse complète. Ces taux élevés de réponse clinique et moléculaire ont été observés quel que soit le type de mutation *CALR*, et des taux aussi élevés de réponses moléculaires aux mutations *CALR* n'ont pas été signalés chez les patients MF traités par le ruxolitinib[265], ni chez les patients TE et MF traités par l'imetelstat[266,267].

6.5.5 Inefficacité sur certains clones

Certaines altérations génétiques pourraient être associées à une résistance à l'IFN. Par exemple, chez certains patients présentant à la fois des mutations *JAK2V617F* et *TET2*, il a été observé que les cellules mutées *TET2* persistaient alors que les cellules mutées *JAK2* étaient nettement réduites[268]. Quintas-Cardama et al[269] ont également observé une différence dans le taux de réponse moléculaire en fonction de la présence ou de l'absence de mutations *TET2* dans une cohorte de patients atteints de NMP traités par peg-IFN. Chez les patients atteints de TE et présentant des mutations *CALR*, il a également été constaté que la présence de mutations additionnelles affectait la réponse au traitement par IFN[263]. Par rapport aux malades ne présentant que des mutations *CALR*, ceux présentant des mutations additionnelles avaient une diminution moins importante de la charge en allèles mutants *CALR*. En outre, une légère augmentation du taux de mutant *CALR* pendant la thérapie IFN a été observée chez 33% des patients présentant des mutations additionnelles, alors qu'une telle évolution n'a été observée que chez 8% des patients présentant uniquement une mutation *CALR*. Ces résultats suggèrent que les altérations moléculaires des voies telles que l'épigénétique peuvent altérer l'efficacité de la thérapie par IFN.

6.5.6 Effets immunomodulateur

Étonnamment, malgré le fait que l'hypothèse immunologique d'une action de l'IFN ait été suggérée au début des années 1980, on ne dispose que de données limitées sur le rôle du système immunitaire dans les effets de l'IFN dans les NMP. Ces effets ont été principalement étudiés dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) et très peu d'études sont disponibles dans les NMP classiques[270–272]. Trois mécanismes majeurs ont été supposés parmi les effecteurs immunitaires, selon la cellule cible : un effet sur les cellules T ou B, un effet sur les cellules NK, et un effet sur les cellules dendritiques (CD).

Il a été suggéré que le traitement par l'IFN entraîne une augmentation de la capacité des CD à stimuler l'activation des cellules T[273]. Une prolifération renforcée des cellules T et une production accrue de cellules T CD4+ et CD8+ stimulée par l'IFN ont été observées, démontrant une restauration de la capacité immunogène des CD tolérogènes en présence de l'IFN. Les expériences de restimulation ont également révélé que le traitement des CD tolérogènes par l'IFN supprimait l'induction de l'anergie des cellules T.

Un deuxième mécanisme immunologique implique la stimulation des cellules NK. Récemment, l'effet de l'IFN sur la persistance de la rémission moléculaire complète dans la LMC ainsi que dans les NMP, s'est concentré sur le rôle des cellules NK. Les patients atteints de LMC traités par IFN en rémission ont un nombre accru de cellules NK, de cellules T clonales γδ+ et un profil unique de cytokines plasmatiques[274]. Ces facteurs peuvent être liés aux effets antileucémiques de l'IFN dans ce groupe spécifique de patients et pourraient expliquer les réponses prolongées au traitement même après l'arrêt du médicament. Riley et al[270] ont démontré que les patients atteints de NMP classiques non traités ont de faibles taux de cellules NK circulantes par rapport aux donneurs sains ou aux patients traités par HU ou IFN, et que le traitement par IFN induit une expansion des cellules NK CD56 fortes circulantes. Les auteurs ont ensuite émis l'hypothèse que les effets de l'IFN sur les cellules immunitaires impliquées dans la surveillance immune pourraient renforcer la réponse anti-tumorale contre le clone mutant *JAK2*.

6.5.7 Activité sur les cellules souches normales et leucémiques

Essers et al[275] ont fait le premier rapport de l'action de l'IFN sur le cycle cellulaire des CSH normales en 2009. Les auteurs ont démontré que l'IFN était capable de forcer les CSH murines dormantes à entrer en cycle cellulaire, de sorte qu'une double action de l'IFN sur les cellules hématopoïétiques est décrite: un effet prolifératif sur les CSH et un effet pro-apoptotique sur les cellules progénitrices plus matures. Ils ont suggéré que ces effets antagonistes étaient liés à une exposition aiguë par rapport à l'exposition chronique à l'IFN. Ces effets étaient directs et non médiés par le système immunitaire ou les cellules intermédiaires, comme l'ont démontré les souris « knockout » (KO) ou inactivées pour le récepteur à l'IFN. Pietras et al[276] ont récemment décrit un mécanisme d'action plus précis de l'IFN sur les CSH. Ces auteurs ont clarifié la relation entre les effets proliférатifs et suppressifs de l'IFN lors d'une exposition aiguë et chronique. Ils ont démontré que l'entrée dans le cycle cellulaire due à l'exposition aiguë à l'IFN était transitoire et que les CSH rentraient en quiescence lors d'une exposition chronique. Ils ont montré que la machinerie du cycle cellulaire n'est pas directement activée par l'IFN *in vivo* et que, au contraire, de multiples mécanismes de mise en quiescence sont temporairement antagonisés puis réactivés pendant l'exposition chronique à l'IFN. L'entrée dans le cycle cellulaire des CSH murine est donc plus probablement un relâchement des multiples mécanismes de renforcement de la quiescence de la CSH plutôt qu'une activation directe de la machinerie du cycle cellulaire. Cependant, alors que la reprise de quiescence protège les CSH exposées à l'IFN de l'apoptose, le fait de les forcer à reprendre leur cycle en présence constante d'IFN entraîne leur épuisement et leur incapacité ultérieure à maintenir l'homéostasie sanguine.

Récemment, des modèles de souris reproduisant une NMP ont permis d'explorer ces résultats dans un contexte de *JAK2V617F*, et leurs résultats ont suggéré que l'IFN éradique les cellules initiatrices de la maladie *JAK2V617F* lors du traitement à long terme, supprimant globalement l'avantage proliférатif des cellules initiatrices de leucémie (LIC) par rapport aux CSH de type sauvage (WT). Les modèles publiés les plus récents étaient des modèles de « knock-in » (KI) démontrant que *JAK2V617F* était suffisant pour provoquer le phénotype de NMP, et ces modèles ont été utilisés pour vérifier si le traitement par IFN pouvait guérir la maladie chez les souris. Dans deux études différentes utilisant des

souris chimériques (c'est-à-dire des souris reconstituées avec un mélange de cellules *JAK2V617F* et *JAK2 WT*) dans lesquelles une NMP est constamment induite après quelques semaines, le traitement par IFN a d'abord conduit à une réduction des paramètres sanguins[181,277]. Les paramètres hématologiques sont rapidement revenus à des valeurs normales, à l'exception de la numération plaquettaire dans l'étude de Mullally et al[277]. L'hématopoïèse extramédullaire, observée dans tous les modèles murins de NMP, a également été réduite après le traitement par IFN, comme le montrent la réduction du poids de la rate et la diminution du nombre de progéniteurs hématopoïétiques spléniques. En revanche, la cellularité de la moelle osseuse a augmenté chez les souris traitées par IFN au stade MF, ce qui suggère une normalisation de l'hématopoïèse.

En ce qui concerne la spécificité de l'activité de l'IFN contre le clone malin de NMP, les auteurs ont montré que la proportion de cellules mutantes par rapport aux cellules WT était fortement réduite chez les souris traitées par l'IFN, ce qui suggère un ciblage préférentiel des cellules mutées. Cette hypothèse a été renforcée par l'analyse des receveurs secondaires dans les expériences de transplantation après la thérapie IFN. En effet, les cellules souches hématopoïétiques à long terme (LT-CSH) *JAK2V617F* ont été identifiées comme le réservoir des cellules initiatrices de la maladie *in vivo*[278] et il est maintenant bien accepté que la capacité à transplanter la maladie chez un receveur secondaire reflète le potentiel malin des cellules souches. Dans les expériences réalisées dans les deux études, les souris transplantées avec des cellules provenant de souris traitées par IFN (transplantations secondaires) n'ont pas développé de NMP[181,277]. Ces résultats suggèrent que l'IFN a le potentiel d'éradiquer les cellules initiatrices de la maladie dans les NMP *JAK2V617F*. Cette propriété semble dépendre d'un effet direct de l'IFN sur les cellules mutées de *JAK2V617F*. En effet, les effets de IFN ont été abolis lorsque les cellules *JAK2V617F* inactivées pour le récepteur IFN (Ifnar1-/-) ont été testées chez des souris chimériques[277]. A partir de ces résultats observés chez les souris KI, l'hypothèse selon laquelle l'IFN pourrait directement activer le cycle cellulaire des CSH *JAK2V617F*, conduire à un épuisement préférentiel des cellules initiatrices de la maladie et aboutir finalement à l'éradication de la maladie à long terme est renforcée.

Les études sur les CSH chez les souris *JAK2V617F* KI ont montré que ces cellules étaient plus prolifératives que les CSH des souris WT[181,277]. Cependant, les deux études analysant les effets de l'IFN au niveau des LT-CSH ont donné des résultats différents. Hasan et al. n'ont pas observé d'augmentation de l'entrée dans le cycle cellulaire des CSH mutées *JAK2V617F* chez les souris traitées par IFN. Ils ont même signalé un effet pro-apoptotique de l'IFN dans ces cellules. En revanche, Mullally et al. ont observé une proportion significativement réduite de CSH quiescentes (et une proportion accrue de CSH en cycle) chez les souris *JAK2V617F* traitées par IFN par rapport aux souris JAK2WT. Il est intéressant de noter que Mullally et al. ont eu l'occasion d'étudier les compartiments progéniteurs *JAK2V617F* plus matures chez des souris traitées par IFN. Ils ont observé une expansion des progéniteurs MEP et l'induction de l'apoptose dans les précurseurs érythroïdes.

6.6 Ruxolitinib

Le ruxolitinib, un inhibiteur JAK1/JAK2[279], est le seul Inhibiteur de tyrosine kinase (TKI) approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) et ayant l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France avec une indication dans la PV et la MF. Le ruxolitinib contrôle l'hématocrite, réduit la taille de la rate et améliore les symptômes associés à la MF en raison de ses effets anti-inflammatoires[280,281].

Cependant, les propriétés immunosuppressives du ruxolitinib rendent les patients atteints de NMP plus susceptibles aux infections virales et bactériennes[282–284]. En outre, le ruxolitinib n'est pas spécifique du *JAK2V617F*, et les rémissions moléculaires complètes sont rares[285].

6.7 Autres agents cytoréducteurs

Un faible nombre de patients atteints de NMP et intolérants aux thérapies cytoréductrices courantes sont traités par pipobroman, busulfan ou du phosphore radioactif (^{32}P). Le pipobroman et le busulfan, des agents alkylants inhibant la granulopoïèse, sont utilisés dans les PV et TE malgré un mécanisme non démontré[232,286]. Le ^{32}P a été utilisé pour traiter la PV et la TE pendant de nombreuses années grâce à des taux d'efficacité allant jusqu'à 90 % pour la prévention des complications thrombotiques et hémorragiques Cependant, son utilisation a été stoppée en raison du risque important de transformation leucémique[287].

6.8 Greffe de moelle osseuse

Le seul traitement des NMP qui a le potentiel de guérir la maladie ou de prolonger la survie est la greffe de cellules souches hématopoïétiques (GMO). La mort ou la morbidité grave liée à la transplantation survient chez plus de la moitié des receveurs de greffe et nécessite donc une évaluation du risque chez chaque patient. Il est actuellement recommandé de pratiquer une GMO dans les cas de MF à risque élevé ou intermédiaire (DIPSS-plus) ou à risque génétique élevé (c'est-à-dire CALR-/ASXL1+). Dans une étude large et représentative[288] , la survie à 5 ans était de 37 % chez les donneurs apparentés et de 30 % chez les donneurs non apparentés. Les taux respectifs de survie sans maladie, de mortalité liée au traitement à 100 jours et de maladie du greffon contre l'hôte de grade 2 à 4 étaient respectivement de 33%, 18% et 43% pour la GMO chez les donneurs apparentés et de 27%, 33% et 40% chez les donneurs non apparentés ; les antécédents de splénectomie ou l'utilisation d'un conditionnement à intensité réduite n'ont pas affecté les résultats, alors que le type de donneur et le score de performance l'ont fait. Une autre étude récente suggère la faisabilité d'une transplantation de sang de cordon provenant de donneurs non apparentés dans la MF, bien que le nombre de patients concernés soit faible[289]. La valeur potentielle d'un traitement par inhibiteur JAK avant la transplantation est actuellement étudiée et dont le centre investigateur principal est à Saint-Louis[290]

III La sénescence

La sénescence cellulaire a été initialement identifiée comme un arrêt permanent du cycle cellulaire causé par la capacité proliférative finie des fibroblastes humains en culture *in vitro*[291,292]. Ce n'est que bien plus tardivement que sa réalité physiologique a été mise en évidence. Aujourd'hui de mieux en mieux définie notamment par la découverte de facteurs déclenchants, la sénescence est également considérée comme une réponse au stress qui peut être induite par un large éventail d'agressions intrinsèques et extrinsèques, notamment l'activation oncogénique, le stress oxydatif et génotoxique, le dysfonctionnement mitochondrial, l'irradiation ou encore la chimiothérapie.

1 Rôles physiologiques de la sénescence

La sénescence cellulaire a d'abord été écartée comme un artefact de culture tissulaire. Cependant, de nombreuses données ont démontré que les cellules sénescentes peuvent influencer la maladie et le vieillissement, ainsi que l'homéostasie normale des tissus. En effet, la sénescence peut être engagée au cours du développement[293,294] et est également nécessaire au remodelage des tissus. Par exemple, l'induction transitoire des cellules sénescentes est observée pendant la cicatrisation et contribue à la résolution des blessures[295,296]. Aujourd'hui il est clairement défini qu'elle peut être un mécanisme de réponse protectrice au stress. Plus particulièrement et pour ce qui nous intéresse ici, la sénescence est surtout connue comme un puissant mécanisme anticancéreux limitant la réplication des cellules prétumorales.

Cependant, l'accumulation de cellules sénescentes est également à l'origine du vieillissement et des maladies liées à l'âge. Le lien entre la sénescence et le vieillissement a été initialement fondé sur des observations de l'accumulation de cellules sénescentes dans des tissus âgés[297]. Il a été suggéré que, pendant le vieillissement, la sénescence des cellules souches et progénitrices pourrait entraver l'homéostasie des tissus en interférant avec la capacité des tissus à se réparer et à se régénérer. Au cours des dix dernières années, notre compréhension des conséquences de la sénescence dans le vieillissement et les pathologies liées à l'âge s'est considérablement élargie. Deux axes de recherche ont facilité cette prise de conscience. Tout d'abord, l'utilisation de modèles transgéniques permettant la détection de cellules sénescentes a permis une identification systématique de ces cellules dans de nombreuses pathologies liées à l'âge. Deuxièmement, le développement de stratégies génétiques et médicamenteuses pour éliminer sélectivement les cellules sénescentes, sous l'impulsion du laboratoire Van Deursen, a démontré que les cellules sénescentes peuvent effectivement jouer un rôle causal dans le vieillissement et les pathologies associées[298].

La confirmation que l'élimination sélective des cellules sénescentes améliore sensiblement la durée de vie des souris dans le contexte du vieillissement normal et atténue les conséquences des maladies liées à l'âge ou des traitements anticancéreux[298–303] a suscité un intérêt pour l'identification de composés capables d'éliminer les cellules sénescentes. Ces thérapies dites sénolytiques restent toutefois confrontées à d'importantes mises en garde. Outre leurs effets secondaires potentiels, l'évaluation des composés sénolytiques est compromise par des limitations telles que l'absence de biomarqueurs universels de sénescence et l'hétérogénéité des phénotypes sénescents *in vivo*. Les recherches en cours sur les voies qui déclenchent et entretiennent la sénescence permettront d'identifier des biomarqueurs et des thérapies potentielles pour cibler les cellules sénescentes.

2 Les différentes phases cellulaires

La caractéristique déterminante de la sénescence est l'établissement d'un arrêt de croissance stable qui limite la réplication des cellules endommagées et anciennes. Cependant, de nombreuses autres altérations phénotypiques associées au programme de sénescence sont pertinentes pour comprendre les fonctions physiopathologiques des cellules sénescentes. Par exemple, les cellules sénescentes subissent des modifications morphologiques, un remodelage de la chromatine et une reprogrammation métabolique, et sécrètent un mélange complexe de facteurs essentiellement pro-inflammatoires appelé phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Les différentes modifications cellulaires qui en sont issues se décomposent de la manière suivante :

- Phase d'initiation : caractérisée par des signaux intracellulaires d'activation des voies indispensables à la sénescence (p53/p21, p16/Rb…) revus plus loin,
- Phase précoce : essentiellement décrite par un remodelage chromatinien, une augmentation du volume cellulaire et des remaniements métaboliques,
- Phase tardive : il s'agit d'une phase plutôt sécrétoire au cours de laquelle la cellule va exprimer de manière auto et/ou paracrine des facteurs inflammatoires et/ou pro-sénescents (Figure 21).

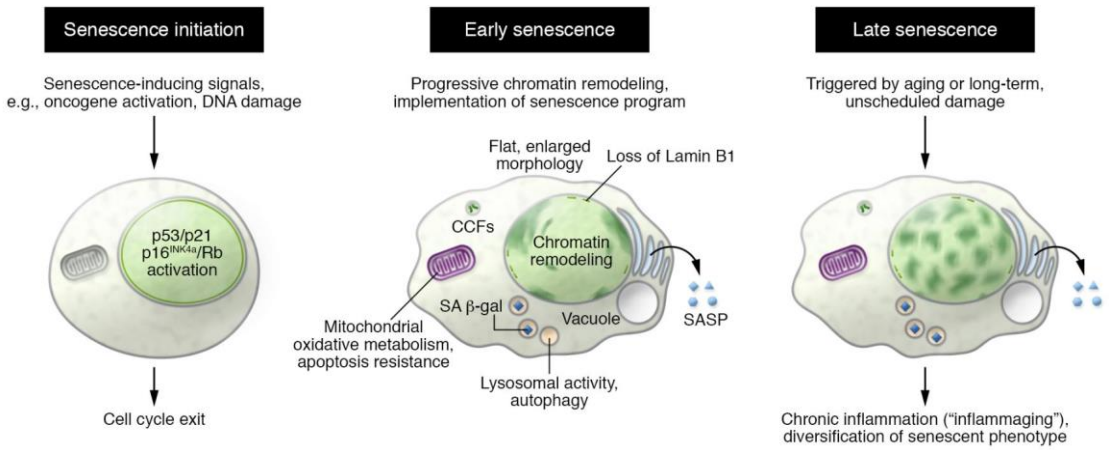


Figure 21 : Caractéristiques phénotypiques des cellules sénescentes. Diagramme illustrant certaines des altérations phénotypiques associées à l'initiation de la sénescence, au début de la sénescence et aux phases tardives de la sénescence (*d'après Herranz et al, JCI, 2018*).

3 Mécanismes de sénescence

3.1 Sénescence et cycle cellulaire

3.1.1 Mécanismes généraux

L'arrêt permanent du cycle cellulaire en phase G1 définit la sénescence. Les mécanismes moléculaires induisant cet arrêt stable implique de nombreuses protéines. La voie d'activation de la sénescence implique *in fine* la protéine du rétinoblastome (Rb)[304,305]. Celle-ci, à l'état déphosphorylé va fixer le facteur E2F, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. Cet état actif dépend des protéines

CDK (Cyclin-Dependent Kinase) qui peuvent phosphoryler Rb et ainsi permettre la libération d'E2F et une progression du cycle cellulaire. Les CDK sont contrôlées par des inhibiteurs de ces protéines. On distingue les protéines de la famille CIP telles que p21, p57 ou p27 et inhibant plutôt le complexe CDK2/Cycline E mais également le complexe CDK4/6/Cycline D[306,307] et la famille INK4/ARF (locus génomique identique appelé *CDKN2A* mais produits d'expression différents et dépendant essentiellement d'un épissage alternatif[308]) avec comme chef de file p16. Cette famille inhibe plutôt les CDK4 et 6[309,310]. Cette inhibition se produit dans les deux cas par fixation de la protéine au complexe CDK2-Cycline E (pour p21 notamment) et CDK4/6-Cycline D (pour p16) et nécessite le domaine N-terminal de la protéine (Figure 22).

L'augmentation de l'expression de ces protéines contribue à une signature d'arrêt de cycle en G1[306,310,311] (Figure 22). La protéine p53 joue évidemment un rôle essentiellement de facteur de transcription activant p21 dans les modèles d'activation de sénescence dépendants de p53 (cf chapitre Implication de p53). Les études montrant que des cellules en phase sénescente surexprimait p16 et p21[299], ainsi que le KO de CDKN1A, Rb et p53[312] entraînant un échappement à la sénescence a suffi à démontrer le rôle prépondérant de ces acteurs dans la promotion de ce processus.

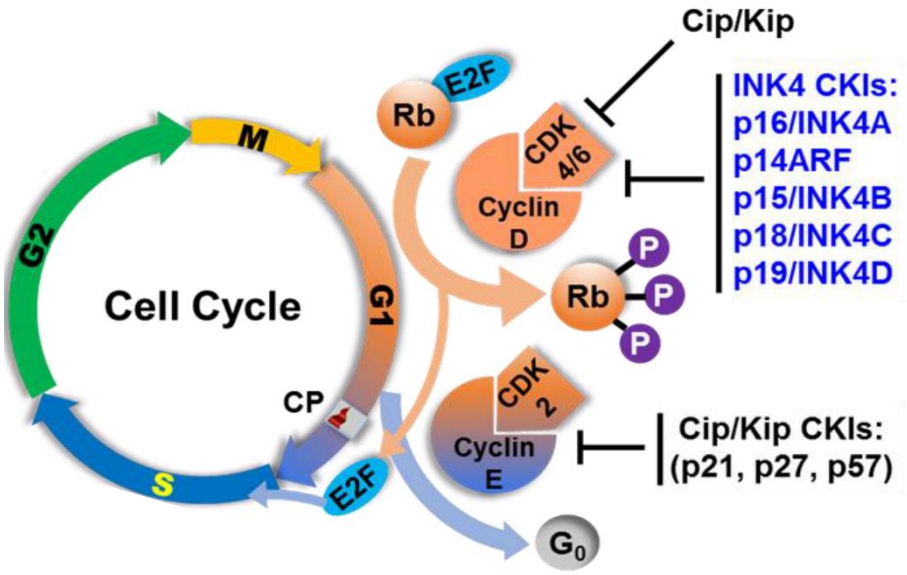


Figure 22 : Cycle cellulaire et mécanismes moléculaires généraux. Les acteurs principaux du contrôle du cycle cellulaire sont décrits. La protéine centrale Rb fixe le facteur E2F empêchant la progression du cycle. Lors de sa phosphorylation par la Cycline D et la Cycline E, la protéine pRb libère le facteur E2F, permettant la reprise du cycle par transition vers la phase S. Les Cyclines sont actives sous forme de complexe avec les kinases de la famille CDK, elles-mêmes contrôlées par des CDK, les protéines de la famille CIP (p21, p27, p57) et de la famille INK4/ARF (p14, p15, p16 et p19) notamment (*d'après Kabir et al, Vet Sci, 2016*).

3.1.2 Implication de p53

En amont de la protéine Rb et des inhibiteurs de CDK décrits plus haut, la protéine p53 joue un rôle important dans l'activation des processus de senescence. L'activation de la voie p53 est une réponse cellulaire courante qui conduit à la sénescence cellulaire lors de l'exposition à des signaux de stress. Ceux-ci sont différents et ne conduisent pas tous à l'activation de la voie p53 (cf chapitre Inducteurs de sénescence). En conséquence, les cellules sénescentes sont caractérisées par une expression accrue de certaines cibles p53, telles que p21[313], PML[314] (cf chapitre Sénescence PML-dépendante) ou l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1)[315], qui sont tous reconnus comme des marqueurs de sénescence et sont à leur tour capable d'induire eux-mêmes la sénescence. On remarquera que les inhibiteurs de la famille INK4/ARF ne sont pas des cibles transcriptionnelles directes de p53, quelle que soit l'état causal[316–318] (Figure 23).

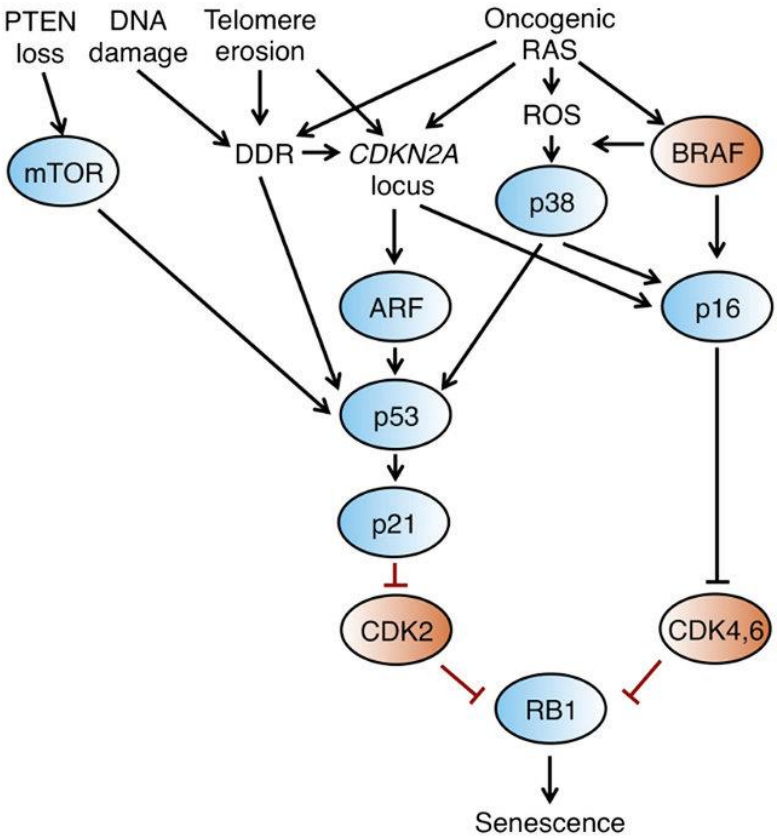


Figure 23: Voie d'activation de la sénescence p53 dépendante. Différentes causes sont à l'origine de l'activation de p53. Celle-ci active notamment l'inhibiteur de CDK2 p21 qui va stimuler la voie finale de la sénescence impliquant les CDK et Rb. On notera que p53 n'active pas l'inhibiteur de CDK4 p16. (*d'après Lujambio et al, Bioessays, 2016*).

Même si tous les mécanismes décryptant les voies d'activation de la sénescence ne sont pas totalement définies, on sait aujourd'hui que la voie activée (p16, p21 et/ou p53-dépendante) dépend principalement de la cause déclenchant le processus.

3.2 Inducteurs de sénescence

3.2.1 La sénescence réplicative

Longtemps, les cellules ont été décrites comme ayant une capacité de division infinie. Alexis Carrel a grandement contribué à cette vision par une expérience débutée le 12 janvier 1912[319], dans laquelle il a maintenu en culture du tissu embryonnaire cardiaque de poulet pendant plus de 20 ans, soit bien plus que la durée de vie normale d'un poulet. Cependant, personne n'a jamais réussi à reproduire cette expérience, malgré de nombreuses tentatives, les cellules pouvant être cultivées sur de longues périodes finissaient par développer des aberrations chromosomiques[320].

Parmi les hypothèses évoquées, le changement de milieu quotidien de Carrel aurait pu permettre l'ajout de nouvelles cellules à la culture, permettant ainsi son renouvellement.

En 1961, Hayflick et Moorhead ont mis en évidence une limite à la capacité de prolifération des cellules humaines normales en culture[291]. Dans cette expérience, ils montrent que la capacité de division des cellules sans modifications de caryotype est limitée. Le nombre de passages observé n'a pas dépassé 55, quel que soit l'origine tissulaire des cellules. Il est intéressant de noter qu'après quelques passages, indépendamment du tissu d'origine, seuls persistent des fibroblastes. Ce nombre de passage limité a par la suite porté le nom de limite de Hayflick. Cette limite, à partir de laquelle les cellules ne se divisent plus marque le moment où les cellules deviennent sénescentes. Ils définissent alors une cellule sénescente comme une cellule ayant perdu sa capacité de prolifération de manière irréversible, malgré des conditions permettant la division : espace, nutriments, facteurs de croissance. Ces cellules, malgré leur sortie du cycle cellulaire, restent vivantes et maintiennent une activité métabolique sur de longues périodes.

On sait aujourd'hui que l'arrêt de la prolifération observé par Hayflick et Moorhead est lié à un nombre important de division des cellules, aboutissant à l'érosion des télomères laissant apparaître une extrémité libre qui sera ensuite reconnue par les mécanismes de détection des dommages à l'ADN induisant *in fine* l'activation de p53 (Figure 23). Les extrémités des télomères sont normalement protégées de la fixation de senseurs des dommages à l'ADN par des complexes composés de protéines shelterin (« le capping ») organisés en T-loop permettant le camouflage des extrémités libres (Figure 24).

Les télomères sont composés de séquences répétées (5'-TTAGGG-3' chez les vertébrés) à l'extrémité des chromosomes et associés à des protéines protégeant de leur dégradation. À chaque division cellulaire, la cellule perd environ 200 pb dû à l'incapacité de l'ADN polymérase de synthétiser totalement le brin antisens terminal.

La taille des télomères est au maximum d'une quinzaine de milliers de paires de bases chez l'Homme, ce qui permet un nombre de division important (75 en théorie) avant de laisser apparaître un bout franc d'ADN et de déclencher le signal classique de dommage à l'ADN (DNA-Damage Response, DDR). Les principaux médiateurs de la DDR sont les kinases ATM, ATR, CHK1 et CHK2, qui phosphorylent et activent plusieurs protéines du cycle cellulaire, dont p53 (Figure 25). La protéine p53 phosphorylée active alors l'expression de p21, qui se lie à certains complexes CDK-cycline et les inhibe, en particulier ceux impliquant CDK2[316], entrainant l'arrêt du cycle cellulaire.

Cette perte de fragments de télomères au fil des divisions et aboutissant à un arrêt permanent du cycle cellulaire est appelé sénescence réplicative puisque la cause primaire en est la division des cellules. Il

s'agit d'un événement programmé, processus physiologique en faveur de la pensée déterministe du destin de chaque cellule.

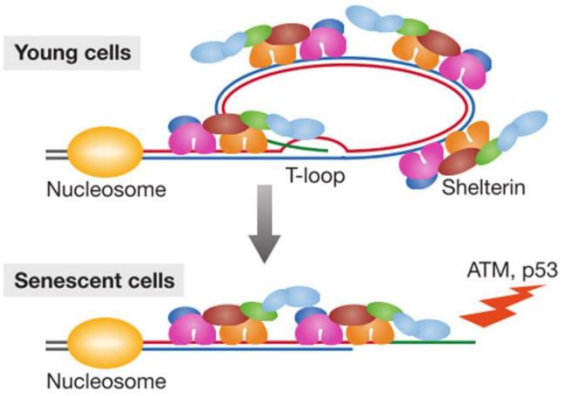


Figure 24 : Devenir des télomères dysfonctionnels. Libération progressive du télomère avec le doublement de la population. Les télomères entièrement protégés dans les jeunes cellules empêchent la signalisation des dommages à l'ADN et le NHEJ. Les télomères partiellement non protégés dans les cellules sénescentes empêchent les NHEJ mais pas la signalisation des dommages NHEJ : Non Homologous End-Joining (*Price et al, EMBOreports, 2012*).

3.2.2 Dérépression du locus *CDKN2A*

La sénescence réplicative est également liée au locus *CDKN2A* (également connu sous les noms *INK4A* et *ARF*), qui code pour deux suppresseurs de tumeurs essentiels, p16 et ARF. Alors que p16 est un inhibiteur de CDK4 et CDK6, ARF régule la stabilité de p53 par l'inactivation de l'ubiquitine-protéine ligase MDM2[321]. Le locus *CDKN2A* est normalement exprimé à des niveaux très faibles dans les tissus jeunes, mais celle-ci augmente avec le vieillissement[297]. Bien que les mécanismes moléculaires responsables de la dérépression de *CDKN2A* ne soient pas complètement compris, il est bien établi que celle-ci dépend dans une large mesure de la perte des complexes répressifs Polycomb[322,323]. Il convient de noter que les dommages causés à l'ADN peuvent réduire les niveaux de protéines ARF en induisant leur dégradation[324,325].

3.2.3 La sénescence prématurée

La sénescence peut également survenir précocement, déclenchée par d'autres mécanismes. Dans ce cas, ce processus agit plutôt comme une protection des cellules contre les agressions cellulaires intrinsèques ou extrinsèques. De nombreuses causes responsables de l'apparition de ce processus ont désormais été décrites, dont la plupart aboutissent finalement à l'activation de la voie des dommages à l'ADN (DDR, Figure 25).

3.2.3.1 Les dommages à l'ADN

La présence d'extrémités libres d'ADN induit une cascade de réponses. L'activation des kinases ATM et ATR phosphoryle le variant d'histone H2AX. La présence de ce variant d'histone est phosphorylée est responsable du recrutement de nombreuses protéines permettant d'ouvrir la chromatine et de propager et d'amplifier le signal de dommages à l'ADN. Les médiateurs interagissent avec les protéines checkpoint du cycle cellulaire, les kinases CHK1 et CHK2. Cela aboutit à l'activation de p53 et des autres effecteurs (Figure 25).

Parmi les caues d'apparition de ces dommages à l'ADN, on note certains agents génotoxiques tel l'étoposide ou la doxorubicine. De ce fait, ces agents utilisés en chimiothérapie induisent la sénescence dans des cellules cancéreuses[326]. De même, l'exposition des cellules aux irradiations γ[327] ou aux UV [328] peuvent aussi déclencher l'apparition d'une réponse aux dommages à l'ADN et l'induction de sénescence.

3.2.3.2 Le stress de culture et les espèces réactives de l'oxygène

Des conditions de culture *in vitro* inadéquates peuvent également aboutir à une sénescence prématurée. On peut citer par exemple l'exposition à de faibles doses de H_20_2[329] comme inducteur de sénescence. De même, il a été démontré[330] que diminuer la concentration en oxygène en culture à des niveaux physiologiques, proche de 5%, permettait d'augmenter le nombre de doublement possible d'une population de fibroblastes murins en diminuant le stress oxydant, aussi capable d'induire la sénescence. Les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmentent après de nombreux types de stress, y compris les chimiothérapies, les dommages à l'ADN et l'activation des oncogènes[331,332]. Le rôle du stress oxydatif comme inducteur de sénescence est démontré par le fait que le traitement aux antioxydants retarde ou empêche la sénescence[333–335]. Mécanistiquement, des niveaux intracellulaires élevés de ROS induits par l'activation de la cascade RAS-RAF-MEK-ERK activent MAPK p38 et entraînent une augmentation de l'activité transcriptionnelle de p53 et une régulation positive de p21 (Figure 25).

3.2.3.3 L'activation oncogénique

Les cellules normales répondent à l'activation de nombreux oncogènes par l'activation d'un processus de sénescence cellulaire. La sénescence induite par les oncogènes (Oncogene-induced senescence ou OIS) a été observée à l'origine lorsqu'une forme oncogène de RAS (RASG12V) a été exprimée dans les fibroblastes humains[317]. La liste des oncogènes capables d'induire la sénescence s'est depuis allongée pour atteindre environ cinquante oncogènes. La perte de suppresseurs de tumeurs peut également déclencher la sénescence, comme l'illustrent les pertes de PTEN[336], de NF1 (également connue sous le nom de neurofibromine)[337] ou d'autres suppresseur de tumeurs tels que Von Hippel-Lindau (VHL)[338].

Il est clairement établi que la sénescence induite par les oncogènes n'est pas uniquement un phénomène observé *in vitro* mais se produit aussi *in vivo*, fonctionnant comme un frein au cours des premiers stades de la tumorigenèse. Une caractéristique générale de la sénescence induite par un

oncogène est la dérépression du locus *CDKN2A*[339]. En outre, ce type de sénescence peut également induire une DDR robuste en raison des dommages causés à l'ADN par une réplication aberrante de l'ADN[340,341] et/ou des ROS[331,332].

L'importance relative de ces mécanismes (p16, ARF ou p53 induite par la DDR, Figure 20) varie selon les types de cellules. Par exemple, dans le cas de la perte de PTEN, les lésions de l'ADN ne semblent pas jouer un rôle important dans la sénescence[336]. De plus, chez la souris, la voie ARF-p53 est un activateur crucial de la sénescence induite par l'oncogène[317,342], alors que chez l'homme, la voie DDR-p53 semble jouer un rôle plus important que la voie ARF-p53[343].

3.2.3.4 Le phénotype de sécrétion

Les cellules sénescentes mettent en œuvre une réponse pro-inflammatoire complexe connue sous le nom de phénotype sécrétoire associé à la sénescence (SASP). Le SASP est médié par les facteurs de transcription NF-κB et CCAAT/enhancer-binding protein-β (CEBPβ), et comprend la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (interleukines 6 et 8 , IL-6 et IL-8), de chimiokines (protéines chimioattractantes de monocytes (MCP) et protéines inflammatoires des macrophages (MIP), facteurs de croissance tels que le TGFβ et le GM-CSF et de protéases[344–346]. La sécrétion de ces protéines par les cellules sénescentes provoque une inflammation et, au moins dans certains cas, elle peut être déterminante pour l'élimination des cellules sénescentes par phagocytose[347]. Les composants du SASP, notamment TGFβ, peuvent également déclencher la sénescence des cellules voisines de manière paracrine, par un mécanisme qui génère des ROS et des dommages à l'ADN[348,349]. Par conséquent, le SASP a de puissantes activités autocrines et paracrines, suggérant que la sénescence crée un microenvironnement inflammatoire qui pourrait permettre secondairement à l'élimination des cellules sénescentes.

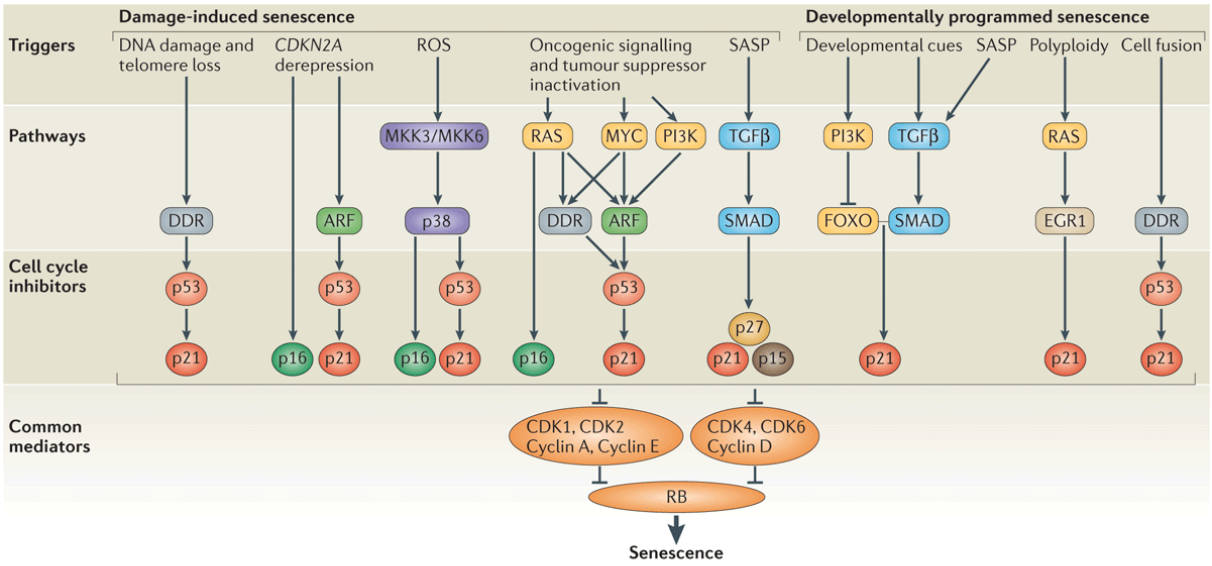


Figure 25 : Voies d'activation causales de la sénescence. De multiples facteurs de stress et agents de dommages (« Triggers ») activent des cascades de signalisation (« Pathways ») qui convergent vers l'activation des inhibiteurs du cycle cellulaire et du suppresseur de tumeur Rb. Les agents de dommages à l'ADN et la perte de télomères activent la réponse aux dommages à l'ADN (DDR), qui active directement p53 et sa cible transcriptionnelle en aval p21 (*Munoz-Espin et al, Nat Rev Mol Cell Bio, 2014*).

3.3 Sénescence PML-dépendante

Le gène PML (Promyelocytic Leukemia) code pour une protéine supposée suppresseur de tumeur et impliquée dans différents processus qui contrôlent l'apoptose, la sénescence et l'auto-renouvellement des cellules souches[350–353]. PML a été initialement identifié comme un partenaire de fusion du récepteur à l'acide rétinoïque humain alpha (RARα) à la suite d'une translocation chromosomique t(15;17) trouvée chez les patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP)[354,355]. PML est exprimée et conservée chez tous les mammifères et est le principal organisateur des Corps Nucléaires à PML (CN-PML). Les CN-PML sont des sphères de 0,1 à 1,0 nm de diamètre intégrées dans la matrice nucléaire et sont exprimés dans la plupart des types cellulaires et tissulaires (Figure 26). La formation de ces structures dynamiques est déclenchée par les DDR, le stress oxydatif, la transformation et l'infection virale[354,356–358]. Plus de 150 protéines ont été identifiées comme des partenaires de PML ou composantes des CN-PML et impliquées dans un large éventail de fonctions cellulaires, notamment la réplication de l'ADN, la transcription, la répression épigénétique, le contrôle du cycle cellulaire, les modifications post-traductionnelles, la réponse antivirale, la réponse et la réparation des dommages à l'ADN, la migration des cellules, l'apoptose, la sénescence et le métabolisme en réponse à différents types de stress. Nous ne discuterons ici que de l'implication de PML dans les processus de sénescence.

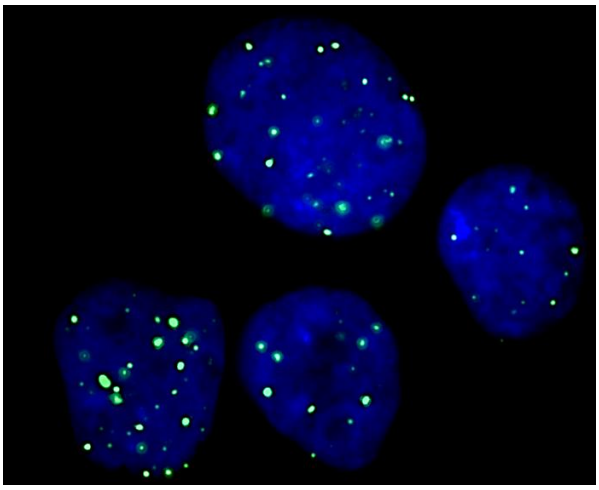


Figure 26 : Immunofluorescence de corps nucléaires à PML (CN-PML) dans des progéniteurs hématopoïétiques normaux (CD34+).

3.3.1 Généralités et structure de PML

PML appartient à la famille des protéines TRIM. Le motif RBCC/TRIM (Figure 27) est présent dans toutes les isoformes de PML et est codé par les exons 1-3[359]. Le domaine RBCC est composé d'un domaine « RING finger » (R), de deux domaines riches en cystéine appelés B-boxes 1 et 2 (B1 et B2) et d'un domaine hélicoïdal (CC) constitué d'hélices α. Le domaine RING est un domaine conservé riche en cystéine qui se lie au zinc et qui est impliqué dans la formation des CN-PML. A côté du domaine RING se trouvent les « boîtes » B1 et B2 qui semblent fonctionner comme deuxième liaison au zinc et sont également impliquées dans la formation des CN-PML[360]. Le domaine CC sert d'intermédiaire à

l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de PML[361]. Toutes les isoformes de PML contiennent le motif d'interaction SUMO (SIM) nécessaire pour la reconnaissance et la liaison des protéines SUMOylées[362] (Figure 26). Plusieurs isoformes de PML, appelées PML I à PML VII, sont exprimées par épissage alternatif d'un seul gène PML et la plupart des isoformes de la protéine, PML-I à PML-VI, contiennent une séquence de localisation nucléaire (NLS). PML-VII, en revanche, n'a pas de NLS et est donc susceptible de se localiser dans le cytoplasme. Cependant, l'épissage alternatif de l'exon 6, qui contient le NLS, a été signalé pour de nombreuses isoformes, ce qui suggère la possibilité que toutes les isoformes de PML peuvent également exister sous une forme cytoplasmique[363]. Notamment, PML-I contient une Nuclear Export Sequence (NES), qui, avec le NLS, peut conduire PML-I à se localiser à la fois dans le noyau et le cytoplasme[364,365]. Toutes les isoformes connues de PML partagent un domaine N-ter commun et diffèrent par leur domaine C-ter, cette dernière confèrant la spécificité de fonction de chaque isoforme de PML. Par exemple : PML-I a été impliquée dans la sénescence, PML-IV dans l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire et la sénescence, PML-V dans la transformation oncogénique médiée par les adénovirus, PML-VI et PML-VII dans l'apoptose[365–368].

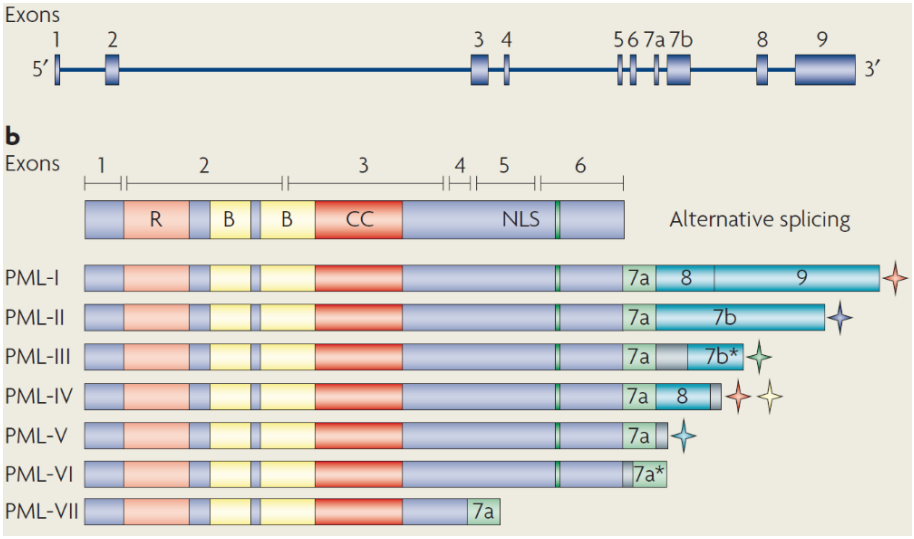


Figure 27 : Structure du gène PML et de ses isoformes protéiques générées par épissage alternatif. NLS: Nuclear Localization Sequence; B: B-box domain, CC: Coiled-Coil domain, R: RING domain (*Bernardi et al, Nat Rev Mol Cell Bio, 2007*).

Les fonctions de PML sont étroitement régulées au niveau post-traductionnel en réponse au stress et au micro-environnement cellulaire. Ces modifications post-traductionnelles (MPT), telles que la SUMOylation, la phosphorylation, l'acétylation et l'ubiquitination, régulent la capacité de PML à interagir avec ses partenaires et lui confèrent une régulation dépendante du stress et de la signalisation activée en aval du stress (Figure 28)[362,369,370].

Le domaine SIM de PML est impliqué dans la phosphorylation directe de la protéine par la caséine kinase 2 (CK-2) sur la Ser-517, ce qui favorise sa dégradation par les systèmes d'ubiquitination[371](Figure 28). Parmi les modifications post-traductionnelles, la SUMOylation est la plus étudiée. Les "Small Ubiquitin-like Modifier"-1 et 2/3 (SUMO1 et SUMO2/SUMO3) se lient de manière covalente à PML. La SUMOylation facilite la formation de CN-PML en favorisant la réponse suppressive de la tumeur de

manière dépendante de PML. La SUMOylation peut également favoriser la dégradation médiée par l'ubiquitine de PML et de la protéine de fusion PML-RARA. PML peut être phosphorylée par plusieurs kinases sur des résidus sérine et thréonine régulant alors ses fonctions. De même, l'ubiquitination régule les fonctions et l'activité de PML[372,373].

Le gène PML a rarement été décrit comme muté dans d'autres tumeurs que les LAP, et son promoteur ne semble pas subir non plus de répression épigénétique. L'épissage alternatif de l'ARN est une source possible de variation des isoformes, mais il n'a pas fait l'objet d'études approfondies. Les modifications post-traductionnelles (MPT) aberrantes de PML sont le mécanisme le plus caractérisé qui explique la perte de PML dans les cancers. Par conséquent, des recherches sont actuellement menées pour mieux comprendre la régulation post-traductionnelle de son activité[374]. La dégradation de PML est favorisée par les MPT, notamment l'ubiquitination, la phosphorylation, l'acétylation et la SUMOylation vues précédemment.

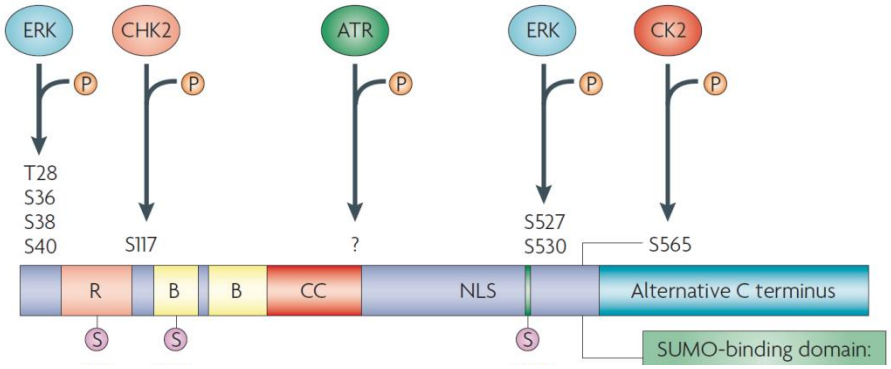


Figure 28 : Modifications post-traductionnelles de PML. Plusieurs kinases connues pour phosphoryler PML sont présentées, notamment les kinases ERK, CHK2, ATM, ATR, et la CK2, ainsi que les résidus d'acides aminés de PML qu'elles phosphorylent. Les trois sites de sumoylation (S) de la PML sont également indiqués, ainsi que le domaine de liaison SUMO qui comprend les acides aminés VVVI aux résidus 556-559. NLS: Nuclear Localization Sequence; B: B-box domain, CC: Coiled-Coil domain, R: RING domain (*Bernardi et al, Nat Rev Mol Cell Bio, 2007*).

3.3.2 Mécanismes de sénescence associés à PML

3.3.2.1 Isoforme IV

À ce jour, l'isoforme de PML la plus étudiée dans le contexte de la suppression des tumeurs est PML-IV (Figure 22). Elle a été décrite à l'origine comme la seule isoforme impliquée dans l'induction de la sénescence prématurée car pouvant interagir physiquement et fonctionnellement avec p53 et pRb, suggérant que PML pourrait jouer un rôle régulateur clé de ces voies[375,376].

3.3.2.2 Interactions avec p53 et ses partenaires

Nous avons précédemment vu que p53 active transcriptionnellement PML. Cependant, PML est également capable de recruter p53 dans les CN-PML (du moins lorsqu'elle est surexprimée), siège de MPT de p53 via le recrutement de partenaires essentiels de la modification de p53[376]. Les CN-PML permettent ainsi d'activer p53 par différents moyens, via son acétylation et sa phosphorylation notamment[377] :

- En réponse aux dommages causés à l'ADN, PML renforce la stabilité de p53 en séquestrant MDM2 (qui est la principale ubiquitine ligase E3 de p53) dans le nucléole de manière indépendante des protéines de la famille ARF[377,378]. Cela facilite l'association de p53 avec des kinases qui confèrent une stabilisation par le biais de modifications post-traductionnelles telles que HIPK-2 (Homeodomain-Interacting Protein Kinase 2) phosphorylant p53 au niveau de la Ser-46, la CHK-2 sur la Ser-20 et la caséine kinase 1 (CK1) sur la Thr-18 [379–381].

- Lors de l'expression de RAS oncogène, p53 est acétylé à Lys-382 et est relocalisée avec la CREB Binding Protein (CBP) acétyltransferase au sein des CN-PML permettant la formation d'un complexe trimérique p53-PML-CBP. L'acétylation de p53, la stabilisation du complexe p53-CBP et la sénescence sont dépendantes de PML, ce qui indique que l'intégrité des CN-PML est nécessaire à l'acétylation de p53 et la sénescence lors de l'expression de l'oncogène[376].

D'autre part, lors de la sénescence induite par l'oncogène, les niveaux d'expression de PML et les CN-PML sont augmentés pendant l'arrêt du cycle induit par RAS oncogène et pendant la sénescence réplicative. Ainsi, l'expression des CN-PML est suffisante pour favoriser une sénescence prématurée : PML augmente les niveaux de p16, de Rb hypophosphorylé, de Ser-15-p53 et d'expression des cibles transcriptionnelles de p53 telles que p21[366]. Les cellules dépourvues de PML présentent une propension réduite à la sénescence en réponse à l'activation p53, malgré l'induction de plusieurs gènes cibles p53[314]. PML est donc un intermédiaire de la signalisation dans la sénescence induite par l'oncogène.

3.3.2.3 Indépendance de p53

PML peut également induire la sénescence dans les fibroblastes primaires humains et de souris de manière indépendante de p53 par un mécanisme qui dépend de la voie Rb[382]. En effet, la surexpression de PML entraîne l'accumulation de Rb hypophosphorylée et potentialise sa fonction par un mécanisme dépendant des histones désacétylases (HDAC)[366].

Plusieurs études ont clairement montré que la surexpression de PML provoquait un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules normales, mais il a également été prouvé qu'elle avait un effet sur les lignées cellulaires tumorales. L'expression de PML peut provoquer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 associé à une diminution significative des Cyclines D1 et CDK2, $p21^{CIP1}$ et de la Cycline E et un état de la protéine Rb principalement hypophosphorylé dans des lignées et des modèles de xénogreffe de cellules primaires de cancer du sein. Ceci suggère que PML exerce ses effets de suppression de la croissance en modulant plusieurs protéines clés de régulation de la phase G1[383].

3.3.2.4 Réorganisation de la chromatine

Des études récentes ont ajouté un niveau de complexité supplémentaire en suggérant que les CN-PML sont impliqués dans la réorganisation de la chromatine pendant la sénescence. La sénescence cellulaire est associée à la formation de focis d'hétérochromatine (SAHF, revu plus loin dans les marqueurs de sénescence). On suppose actuellement que ces domaines répriment l'expression des gènes impliqués

dans la progression du cycle cellulaire[384]. Il est intéressant de noter qu'un certain nombre de gènes cibles de E2F acquièrent des caractéristiques d'hétérochromatine au cours de la sénescence, et que la Rb, active, se lie à leurs promoteurs. Par ailleurs, Rb est nécessaire à la formation de SAHF et à la répression du gène E2F pendant la sénescence. Les SAHF et les CN-PML sont tous deux induits au cours de la sénescence cellulaire[385].

3.3.2.5 Régulation par l'Interféron

Au cours de la sénescence PML-dépendante, PML est induit par p53, mais aussi par les facteurs de transcription de la voie IFN/JAK/STAT. En effet, PML est régulé transcriptionnellement par la voie de l'interféron via les facteurs de transcription STAT[386]. Ainsi, le traitement des cellules humaines primaires par l'interféron β conduit à l'induction de PML, p53, et à un processus de sénescence[387]. De ce fait, la signalisation constitutive STAT5 peut activer l'expression de PML et induire une réponse de sénescence cellulaire dépendante de p53 et de Rb. En particulier, l'expression de STAT5A conduit à une régulation négative de MYC et de ses cibles, y compris CDK4. La régulation négative de MYC est corrélée à sa localisation dans les CN-PML, abondants durant la sénescence induite par STAT5[388].

D'autre part, des mécanismes d'inhibition de la prolifération cellulaire dépendants de PML et indépendants de p53 et/ou de pRb ont également été démontrés. En effet, PML régule positivement la sénescence réplicative par séquestration de la télomérase transcriptase inverse (TERT) dans les CN-PML, en réponse au traitement par IFN[389].

3.3.2.6 Régulation par l'Arsenic

a. Histoire de l'utilisation de l'Arsenic

Depuis plus de 2 400 ans, l'arsenic - du grec arsenikon, qui signifie "puissant" - est utilisé à la fois comme agent thérapeutique et comme poison. À l'époque, Hippocrate utilisait les sulfures d'arsenic Réalgar et Orpiment pour traiter les ulcères, et Dioscoride utilisait Orpiment comme dépilatoire.

Dans les années 1700, l'inventeur anglais Thomas Fowler a mis au point une solution de trioxyde d'arsenic dans du bicarbonate de potassium (1% p/v) qui était utilisée pour traiter l'asthme, la chorée, l'eczéma, le pemphigus, le psoriasis, l'anémie, le lymphome de Hodgkin et la leucémie.

En 1878, on a découvert que ce composé, judicieusement appelé "solution de Fowler", faisait baisser le nombre de globules blancs chez les personnes normales, une baisse plus importante se produisant chez les personnes atteintes de LMC traitées pendant 10 semaines. Après cette découverte, la solution de Fowler a été utilisée comme base dans le traitement de la leucémie jusqu'à ce qu'elle soit remplacée par des radiations au 20e siècle.

Cependant, le traitement au trioxyde d'arsenic a fait une brève réapparition en 1931 après qu'un rapport a indiqué que neuf patients atteints de LMC avaient répondu au traitement à l'hôpital de la ville de Boston. Le nombre de globules blancs de ces patients est passé de plusieurs centaines de milliers par millimètre cube à une valeur à peu près normale ; leur foie et leur rate ont diminué de taille. Les échantillons de biopsie de moelle osseuse ont révélé des hématopoïèses apparemment normales et la qualité de vie des malades semblait améliorée.

La réutilisation du traitement a été de courte durée après que les chercheurs aient signalé un empoisonnement chronique à l'arsenic chez cinq des six patients traités pour la LMC. Sur la base de

ces résultats, les chercheurs ont recommandé une observation attentive des patients lors de l'utilisation de la solution. Avec le temps, l'utilisation du trioxyde d'arsenic a diminué et a été à nouveau remplacée - cette fois par la radiothérapie et la chimiothérapie cytotoxique.

En 1910, le salvarsan, un arsenic organique, a été introduit par le lauréat du prix Nobel, médecin et fondateur de la chimiothérapie, Paul Ehrlich. Son composé, qui était l'un des 500 composés organiques de l'arsenic, a guéri la syphilis. Aujourd'hui, ce composé est toujours utilisé dans le traitement de la trypanosomiase.

b. LAP et mécanisme d'action

Le changement s'est opéré lorsqu'en 1992, un groupe de Harbin, en Chine, a déclaré utiliser un médicament traditionnel chinois, "Ai-ling 1", pour traiter avec succès des patients atteints de leucémie promyélocytaire (d'après *H. Sun et al, Chin. J. Integrat. Tradit. Chin. West. Med. 12, 1701, 1992*). Il a été démontré que le principe actif d'Ai-ling 1 était le trioxyde d'arsenic, qui a induit des rémissions chez les patients atteints de leucémie promyélocytaire, y compris ceux qui avaient rechuté après un autre traitement antérieur. Compte tenu des effets cliniques majeurs observés dans cette maladie, l'exploration mécanistique a rapidement montré qu'il s'agissait d'une thérapie ciblée. En effet, dans ce modèle, il a été montré que l'arsenic provoque la dégradation de PML normale, ainsi que de la protéine de fusion PML-RARα. L'arsenic induit également la SUMOylation et l'ubiquitination de PML-RARα, le transfert de la PML-RARα vers une matrice nucléaire insoluble, et la dégradation des deux formes de PML dans ce contexte [362,373,390–392]. Mécanistiquement, Zhang et al. ont montré que l'arsenic agit en se liant directement aux groupes thiol de la protéine PML, provoquant d'un côté la dégradation de PML-RARα et la réactivation de CN-PML physiologiques dans les cellules souches leucémiques[393] (Figure 29).

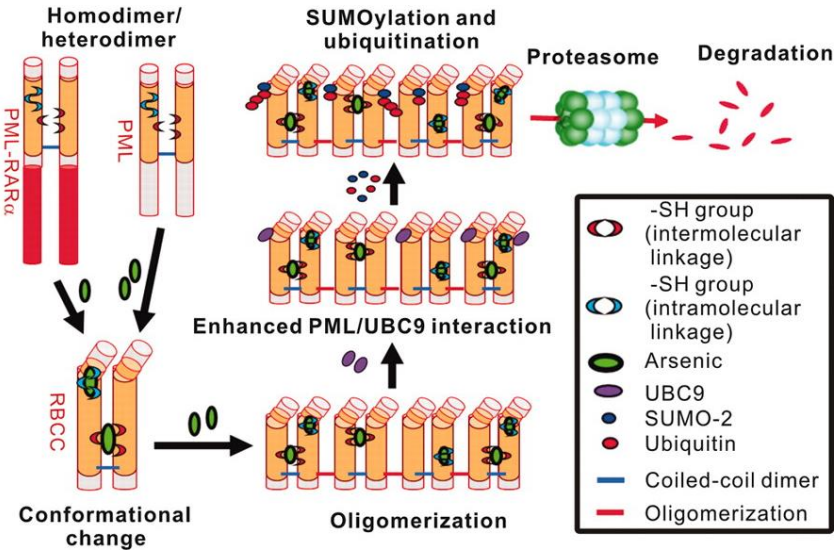


Figure 29 : Mécanisme d'action de l'As_2O_3 dans le modèle de la LAP. L'As_2O_3 se fixe au niveau des cystéines du domaine RBCC de PML normal ou PML-RARa, ce qui entraine l'oligomérisation des dimères de PML, et la formation de CN-PML avant leur dégradation par la SUMOylation et ubiquitination par UBC9 (*d'après Zhang et al, Science, 2010*).

Cette reformation de CN-PML permettant ainsi une activation de sénescence p53-dépendante et une éradication de ces ce pool de cellules souches, expliquant les rémissions moléculaires obtenues et la guérison des malades[394] (Figure 30).

D'autres modèles suivant l'hypothèse de dégradation de l'oncogène par l'arsenic ont été étudiés tels que les ATLL. En effet il a été montré que dans ce contexte la protéine oncogénique TAX est dégradée par l'Arsenic, processus amélioré par l'ajout d'IFN et l'activation d'un processus de sénescence PML et p53-dépendants[395–397]. Un essai clinique associant les deux drogues a été mené dans les ATLL a montré la bonne tolérance de l'association ainsi que des cas de rémission complète[398].

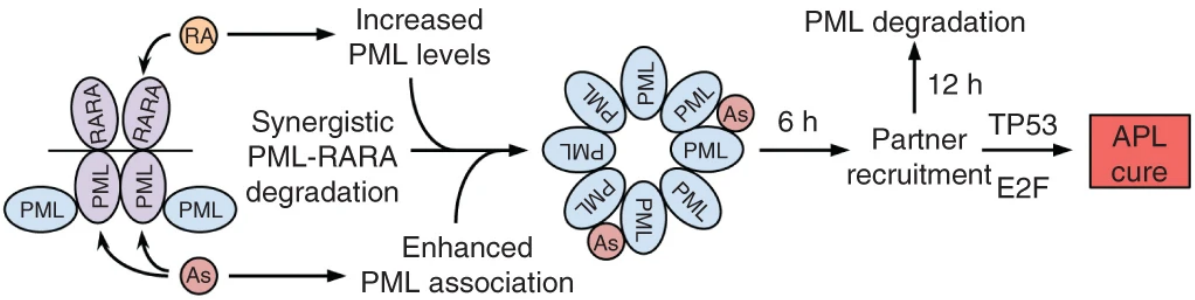


Figure 30 : Modèle de guérison de la LAP par combinaison de thérapie comprenant l'As_2O_3. La fixation de l'As_2O_3 sur PML active la dégradation de PML-RARa et la reformation des CN-PML normaux, permettant, à des temps très courts, un recrutement et une activation de sénescence p53-dépendante, aboutissant à la guérison de la LAP. La combinaison à l'acide rétinoïque (RA) permet de potentialiser ces effets (*d'après Ablain et al, Nature Medicine, 2014*).

4 Marqueurs utilisés pour mettre en évidence la sénescence

Il n'existe pas à ce jour de marqueur spécifique de la sénescence. On a donc recours à une concomittance de différents marqueurs non spécifiques pour définir le phénotype de sénescence.

Plusieurs marqueurs permettent d'identifier la sénescence cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Le marqueur le plus spécifique et le plus utilisé de la sénescence cellulaire est l'activité SA-β-galactosidase (Senescence-Associated-β-galactosidase), révélée à pH acide[399]. La détection de l'activité β-galactosidase à pH acide (SA-β-Gal) est un marqueur quasi-spécifique des cellules sénescentes. Cette activité est d'origine lysosomale. On révèle ainsi l'activité SA-β-Gal dans les lysosomes par histochimie à pH=6. On utilise comme substrat de la SA-β-gal le X-Gal (5-bromo-4-chloro-3indolyl-d-galactopyranoside). L'activité SA-β-Gal est visualisée par une coloration bleue-verte des cellules.

Cependant, même l'activité de la β-galactosidase (SA-β-Gal) associée à la sénescence, la marque de facto de la sénescence[399], peut aussi refléter une activité autophagique accrue, du moins dans certains cas ou être négative dans d'autres[400]. L'association à d'autres marqueurs est donc indispensable pour définir un processus de sénescence.

Les cellules sénescentes sont définies en premier lieu par un arrêt de prolifération cellulaire. Elles sont donc identifiées par une absence de réplication de l'ADN, qui peut être objectivée *via* l'incorporation dans l'ADN de 5'bromodéoxyuridine (BrdU) ou de thymidine H^3. Cependant, cette propriété est partagée par les cellules en quiescence ou par les cellules post-mitotiques.

La présence de corps nucléaires à PML (CN-PML) et leur activation en fonction du contexte présente également un marqueur phénotypique de sénescence clairement établi[401].

L'expression d'inhibiteurs du cycle cellulaire, comme $p16^{Ink4a}$, $p21^{CIP1}$ ou $p27^{Kip1}$, est aussi un marqueur des cellules sénescentes. Le type d'inhibiteur de CDK impliqué dépend du type cellulaire et des voies de signalisation activées au cours de la sénescence. D'autres protéines, dont le rôle n'est pas clairement établi, sont également induites au cours de ce processus, comme DEC1 (differenciated embryo-chondrocyte expressed 1)[402] DCR2 (decoy death receptor-2)[403] ou la cathepsine D[404].

Enfin, des marquages cytologiques permettent de mettre en évidence les SAHF ou des SDF (Senescence-Associated DNA-damage focis), présents au niveau des cellules sénescentes. Les SAHF peuvent être détectés par marquage de l'ADN avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole), faisant apparaître des foyers d'hétérochromatine, ou par la présence de composants de l'hétérochromatine comme des histones modifiées (histone H3 méthylée sur le résidu Lys9, H3K9met), les protéines HMGA ou les protéines HP1 (heterochromatin protein-1). Chez l'homme, comme nous l'avons évoqué, les SAHF contiennent en partie des gènes cibles de E2F, réprimés au niveau de l'hétérochromatine. Les SDF contiennent des protéines intervenant dans les mécanismes de réparation de l'ADN, comme H2AX, que l'on peut détecter par immunomarquage[405].

Enfin, la récente caractérisation détaillée du SASP, au cours duquel la transmission des molécules sécrétoires aux cellules voisines diminue pendant la transmission paracrine, fournit également des preuves d'une variation qualitative du phénotype de sénescence[348]. Les différents marqueurs de sénescence sont listés de manière exhaustive dans la Figure 31.

Table 1. *Selected list of senescence markers*

Markers
Phenotypic markers
Lack of cell proliferation
Large and flat morphology of cells
Lack of response to growth factors
SA-β-Gal (senescence-associated β-galactosidase activity)
PML nuclear bodies
SAHF (senescence-associated heterochromatic foci)
SASP (senescence-associated secretory phenotype)
TIF (telomere dysfunction-induced foci)
TAF (telomere-associated foci)
DNA-SCARS (DNA segments with chromatin alterations reinforcing senescence)
Molecular markers
CDKIs (p16, p21, etc.)
p53
ARF
DEC1 (BHLHE40)
DCR2 (TNFRSF10D)
DDR (ATM, 53BP1, γ-H2AX, MBS1, CHK2, etc.)
SASP factors and receptors (IL6, IL8, IL1, MMPs, PAI1, etc.)
HMGA proteins
Heterochromatin markers (HP1, H3K9me3, etc.)
Lamin B1 reduction

Some markers, such as DEC1, DCR2, and heterochromatin markers, are less commonly used than others.

Figure 31 : Marqueurs phénotypiques et moléculaires utilisés pour mettre en évidence un processus de sénescence. (*Salama et al, Genes Dev, 2014*).

5 Sénescence et Hématopoïèse

5.1 Cellules souches hématopoïètiques et vieillissement

Les inducteurs de sénescence classiques tels que l'irradiation et les chimiothérapies ont déjà été démontré comme capable de cibler également les CSH, expliquant en partie les mécanismes de toxicité médullaire associés à ces thérapies[406]. Peu d'études ont cependant exploré le phénotype de sénescence des CSH au cours du vieillissement. Récemment, un groupe a comparé le profil sénescent des CSH de sujets jeunes avec des CSH de sujets âgés, mettant en évidence une fréquence accrue des marqueurs positifs dans les cellules âgées (SA-β-Gal et mise en évidence d'un SASP). Cependant, chez les malades présentant des lésions génétiques dans les CSH favorables à un état pré-leucémique tel que défini par l'hématopoïèse clonale, il n'existe pas de données aujourd'hui associant type d'anomalie génétique, degré d'échappement à la sénescence, et risque d'évolution vers une hémopathie.

5.2 Mégacaryopoïèse

En ce qui concerne l'engagement des CSH dans la lignée mégacaryocytaire, il a récemment été montré que dans le système hématopoïétique, la différenciation en progéniteurs mégacaryocytaires puis en plaquettes matures nécessite lors de la maturation des précurseurs un arrêt de cycle cellulaire qui exprime des caractéristiques de sénescence (Mégacaryocytes SA-β-Gal positifs, induction de p21 et p16 et marquage HP1 positif). Cette induction est dépendante de la TPO et de la voie MAP kinase (ERK) et indépendante de p53. Dans les mégacaryocytes tumoraux de néoplasie myéloprolifératives (MF), il a été montré dans la même étude que les mégacaryocytes développent un phénotype d'échappement à la sénescence (SA-β-Gal négative, expression de p16 et p21 diminués)[407] décrit tel qu'un échappement à un mécanisme d'OIS. L'hyperplasie mégacaryocytaire observée dans ces pathologies et jouant ainsi un rôle central dans la physiopathologie de la maladie pourrait ainsi être lié à un défaut de sénescence ayant pour origine une suractivation de la voie JAK-STAT.

6 Echappement à la sénescence dans les cancers

Les cellules étant toutes dôtées d'une capacité à rentrer en sénescence en présence d'un oncogène selon des facteurs déclencheurs cités précédemment, il semble assez contradictoire de voir que certaines cellules échappent à ce frein prolifératif et à engendre un état prétumoral ou tumoral au sein des tissus. L'explication la plus probable de cet échappement à l'OIS est une altération de la fonctionnalité de l'un des acteurs direct de l'activation de la voie de sénescence (p16 , p21, p53, Rb…)[408]. L'oncogène peut également altérer secondairement un processus de sénescence par un mécanisme autre tel qu'une régulation transcriptionnelle ou épigénétique de l'un des checkpoint du cycle cellulaire[340]. Enfin, des anomalies génétiques autres surajoutées et dont le rôle dans la sénescence est connu[409] ou non peuvent autres surajoutées. D'autres anomalies génétiques pourraient être à l'origine d'une résistance à l'induction de sénescence mais des mécanismes d'échappement lors de l'acquisition de lésions génétiques restent à explorer au cas par cas[410,411]. En effet, il a été montré dans les mélanomes mutés *BRAFV600F* que l'augmentation de l'activité de deux méthylases H3K9 surpasse l'OIS RAS-induite. De la même manière, l'expression d'un composant important du PRC2, la méthytransférase EZH2, entraine une résistance à l'induction de sénescence par répression de p21[412]. Sachant que ce gène est muté dans un nombre important d'hémopathies myéloïdes[207], ces sous-groupes moléculaires pourraient être plus sensible à une thérapie pro-sénescente.

Enfin, les cellules qui échappent à la sénescence peuvent présenter de multiples anomalies génomiques à en juger par leur caryotype très aberrant et l'expression de gènes associés à l'instabilité chromosomique.

7 Thérapeutiques antitumorales pro-sénescentes

Les stratégies thérapeutiques visant à induire ou réinduire la sénescence dans un contexte tumoral ont été imaginées. Nous avons vu précédemment comment certaines drogues utilisées en chimiothérapie pouvaient être considérées comme des inducteurs de sénescence et des anticancéreux. Par conséquent, de nombreux régulateurs de l'OIS désormais identifiés offrent une série de nouvelles possibilités d'exploiter ces médiateurs de manière thérapeutique pour traiter les cancers qui ont surmonté le frein de l'OIS.

7.1 Thérapies pro-sénescence

En réalité, de nombreuses thérapies cytotoxiques standards endommageant l'ADN et visant à tuer les cellules cancéreuses ont pour conséquence involontaire d'induire de la sénescence (Therapy-induced senescence ou TIS). Cependant, celle-ci ne se produit généralement que dans un sous-groupe de cellules[413]. L'objectif principal d'une approche thérapeutique pro-sénescente est de rétablir la sénescence dans les cellules cancéreuses qui ont surmonté le frein prolifératif de la sénescence oncogénique.

Plusieurs composés non dommageables pour l'ADN ont été démontrés lors d'essais cliniques comme favorisant la sénescence, notamment :

i) Le ciblage de la sénescence réplicative par inhibition de la télomérase par le GRN163L (Imetelstat). Bien que ce rationnel aie pour but une réactivation de la sénescence, les données montrent plutôt une induction d'apoptose[266,267,414].

ii) La modulation du cycle cellulaire : l'inhibition des CDK par exemple les inhibiteurs CDK2 CVT-313, -2584 ou de CDK4/6[415,416].

iii) Ciblage direct de p53 : la stabilisation de p53 par l'inhibiteur MDM2 Nutlin[417] et la réactivation de p53 mutant avec APR-246[418].

iv) Ciblage de la voie PTEN (PICS): L'hyperactivation de la signalisation PI3K via une inhibition accrue de la PTEN en utilisant VO-OHpic provoque l'induction de sénescence dans les lignées cellulaires de cancer de la prostate avec une expression réduite de la PTEN[336].

v) Ciblage de PML :
   a. Association de l'ATRA et du trioxyde d'arsenic (As_2O_3). L'arsenic est un composé qui se fixe directement à PML via des ponts disulfures et entraîne l'agrégation des CN-PML, mécanisme à l'origine de leur reformation dans les LAP. Ce processus a pour effet dans les cellules initiatrices de la leucémie de LAP d'induire leur éradication par une voie p53-dépendante[393,394].
   b. Alimonti et ses collègues ont également testé une bibliothèque de thérapies ciblées ~500 en développement préclinique avancé dans les MEF *Pten*-/- pour identifier les composés qui augmentent la sénescence[419]. Ils ont constaté que les inhibiteurs de la caséine kinase 2 (CK2) augmentaient la sénescence des *Pten*-/- en stabilisant les niveaux de PML. En outre, l'inhibiteur de la CK2 CX-4945 a bloqué la progression de la tumeur dans un modèle de souris *Pten*-/- spécifique des cellules épithéliales de la prostate en induisant la sénescence.
   c. El Hajj et al ont pu montrer déjà que la combinaison IFN+As_2O_3 a été associé au raccourcissement des télomères, à la DDR et donc à l'activation de l'axe PML/p53 et à la sénescence des cellules tumorales dans les leucémies/lymphomes T de l'adulte liés au virus HTLV-1[397].

7.2 Thérapies sénolytiques

Les stratégies pro-sénescentes visant à rétablir le frein à la prolifération dans les cellules cancéreuses ont pour conséquence négative potentielle que les cellules conservent un SASP inflammatoire chronique, qui pourrait favoriser la prolifération et la métastase des tumeurs[420–422]. En outre, ces cellules sénescentes peuvent entraîner une résistance au traitement et une transformation maligne[423].

Pour ces raisons, une autre stratégie émergente consiste à éliminer de manière sélective les cellules cancéreuses sénescentes.

Un criblage CRISPR/Cas9 et un criblage de composés ont permis d'identifier des inducteurs de sénescence dans le mélanome provoqué par *BRAFV600E*. Un traitement qui pourrait éliminer les cellules sénescentes a alors été ajouté[424]. L'étude a montré que la suppression de la composante SWI/SNF SMARCB1 et le ciblage thérapeutique avec les inhibiteurs de kinases Aurora étaient de puissants inducteurs de sénescence. Les auteurs ont ensuite démontré la synergie avec l'inhibiteur ABT-263 utilisé dans les lymphomes B (famille pan-Bcl) qui s'est avéré sélective pour induire la disparition des cellules sénescentes[303,425,426].

Une étude récente montre un criblage de composés identifiant des agents ayant une activité sénolytique dans les cellules A549 de cancer du poumon non à petites cellules, qui abritent des mutations de *KRAS* et du *CDKN2A* induites à la sénescence par la bléomycine[427]. Les glycosides cardiaques, agissant par inhibition de la pompe à ATPase Na+/K+, ont induit l'apoptose dans les cellules sénescentes A549 induites par la bléomycine ainsi que dans les fibroblastes humains subissant un une sénescence induite par l'oncogène RAS. La digoxine, un glycoside cardiaque utilisé en clinique pour traiter l'insuffisance cardiaque, est un exemple clair d'un médicament capable d'être repositionné comme agent sénolytique. Un screening complémentaire utilisant un modèle de fibroblastes IMR90 a également montré que les glycosides cardiaques étaient des sénolytiques à large spectre[428].

Les cancers séreux de haut grade avec une activité MYC, RAS/MAPK et PI3K/AKT dérégulée montrent également des réponses variées aux inhibiteurs des enzymes poly-ADP ribose polymérase (PARP). En réponse à l'inhibition de la PARP, les cellules rentrent en sénescence de manière réversible[429]. Un traitement séquentiel avec des inhibiteurs de la PARP, suivi d'un certain nombre de composés sénolytiques connus permet d'induire de manière préférentielle la mort cellulaire *in vitro* et par xénogreffes chez des souris immunodéficientes.

Une stratégie associant donc un inducteur de sénescence et une drogue éliminatrice de cellules sénescentes pourrait donc représenter une approche thérapeutique nouvelle dans le traitement antitumoral.

7.3 Inhibition du SASP

La sénescence est un mécanisme intrinsèque de suppression des tumeurs et peut favoriser une réponse immunitaire anti-tumorale non autonome des cellules, jouant un rôle bénéfique dans la clairance des cellules[347]. En revanche, elle peut également être nocive dans un contexte inflammatoire chronique. Les tumeurs de la prostate de souris PTEN-nulles traitées au docétaxel présentent ainsi un SASP immunosuppressif[422].

Une approche pour lutter contre cet effet est l'utilisation d'agents pharmacologiques qui bloquent la voie JAK/STAT et le SASP immunosuppresseur pour "reprogrammer" le SASP vers une surveillance immunitaire anti-tumorale. Ce traitement est spécifique aux tumeurs PTEN-nulles, car les tumeurs induites par KRAS oncogène présentent principalement un SASP anti-tumoral, ce qui suggère que le fond génétique de la tumeur joue un rôle essentiel. Il est nécessaire de comprendre ces programmes de sénescence spécifiques à l'oncogène et les phénotypes de réponse immunitaire associés dans des modèles animaux immunocompétents avant d'utiliser la reprogrammation du SASP comme approche thérapeutique efficace. Tasdemir et al. ont utilisé une approche similaire pour évaluer les effets de l'inactivation génétique de BRD4 ou de l'inhibition de BRD4 avec l'inhibiteur de BET I-BET762 (iBET)[430].

Ils ont déterminé que BRD4 est nécessaire pour le SASP et la surveillance immunitaire mais ne pouvait pas inverser l'arrêt de croissance ; cependant, il est intéressant de noter que dans ce contexte, les hépatocytes sénescents n'ont pas progressé vers le CHC à l'exception d'une souris sur dix, ce qui suggère qu'une population rare exprimant des oncogènes pourrait encore être capable d'échapper à la sénescence et de se transformer en tumeur maligne.

8 Conclusion : nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la sénescence dans les hémopathies

Comme il n'y a pas de réponse simple quant à la caractérisation de la sénescence, il n'y a pas non plus de réponse claire à la question de savoir si et quand la sénescence est une réponse bénéfique ou moins souhaitable aux thérapies anticancéreuses. Les agents chimiothérapeutiques conventionnels, mais peut-être aussi de nombreux autres médicaments anticancéreux, agissent dans une certaine mesure par l'induction de la sénescence. Etant donné les défauts fréquents d'apoptose dans les tumeurs malignes primaires, la sénescence agit dans de nombreuses tumeurs comme un mécanisme de sauvegarde supplémentaire. Avec la prise de conscience croissante de la complexité de la sénescence, des stratégies apparaissent maintenant qui séparent les aspects positifs des aspects moins désirables, par exemple en favorisant l'arrêt plutôt que la sécrétion[431]. De plus, l'induction de la sénescence n'est pas un choix binaire mais reflète un continuum dans lequel les différentes modifications cellulaires associées à la sénescence ne se manifestent pas nécessairement à des intensités similaires. Le degré d'altération des fonctions cellulaires peut varier entre les différents tissus et les causes de sénescence[423]. Enfin L'action secondaire des cellules sénescentes sur les cellules voisines homotypiques et non sénescentes et leur impact sur les cellules immunitaires hétérologues, stromales ou hôtes n'est que l'ouverture d'une avalanche d'effets de réseau ultérieurs. Les analyses de cellules individuelles aideront à caractériser plus en profondeur le spectre phénotypique des cellules sénescentes au sein d'une population, et des études plus sophistiquées sont nécessaires pour suivre la dynamique transcriptionnelle des cellules individuelles vitales sur leur chemin vers la sénescence et, peut-être, leur progression vers un état "d'inversion" après la sénescence.

L'apparente contradiction entre l'obtention d'un résultat bénéfique par l'induction ou la restauration de la sénescence d'une part et l'élimination des cellules sénescentes d'autre part est plutôt une interprétation logique d'une réponse initialement utile, supprimant la tumeur, qui se transforme en un état potentiellement délétère, pro-inflammatoire, mitogène, reprogrammé par la sténose, mais ne semble pas irréversible[411]. En conséquence, les stratégies de létalité synthétique qui évoquent d'abord la sénescence puis éliminent les cellules cancéreuses sénescentes particulièrement vulnérables aux agents sénolytiques semblent très prometteuses pour des thérapies anticancéreuses conceptuellement nouvelles[423,424,432].

Deuxième partie: Rationnel du projet et objectifs

L'objectif de ce travail de thèse répond à une démarche intégrative autour de l'étude des Néoplasies Myéloprolifératives. En effet, nous avons dans un premier temps travaillé sur le paysage moléculaire des NMP et avons décrit et caractérisé dans notre cohorte de nouveaux variants moléculaires retrouvés dans les NMP. La deuxième partie du travail repose sur des aspects thérapeutiques par l'exploration du mécanisme d'action de l'IFN, une drogue déjà largement utilisée dans les NMP, seul et en association d'autres drogues dans le but d'améliorer son efficacité.

1ère partie : Caractérisation de nouveaux variants moléculaires dans les NMP

Le paysage moléculaire des NMP évolutifs être très complexe, comprenant des mutations dites initiatrices et des mutations additionnelles, les malades pouvant se retrouver avec des combinaisons de mutations multiples. Comme vu précédemment, celles-ci jouent un rôle dans l'évolution de la maladie, et impactent de manière évidente le pronostic.

Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans les NMP sont bien décrites et reportées dans la littérature. Cependant, certains gènes restent peu explorés. De plus, certains variants notamment dans le gène JAK2 ne sont pas caractérisés fonctionnellement. Au laboratoire de biologie cellulaire, nous disposons d'une importante cohorte de NMP caractérisée moléculairement par séquençage de haut débit (NGS), nous permettant de détecter aussi bien les mutations initiatrices que les mutations additionnelles sur un panel de 36 gènes.

Nous avons pu mettre en évidence de nombreux variants dans des gènes initiateurs tels que *JAK2* et *CALR* mais également dans des gènes dont le rôle est beaucoup moins reporté dans la physiopathologie de la maladie, comme le gène codant pour la Cycline D2 (*CCND2*).

Nous nous sommes tout d'abord intéressé aux variants peu fréquents situés dans le gène JAK2. Certaines de ces mutations sont assez fréquentes, reportées dans la littérature et pour certaines déjà caractérisées fonctionnellement, mais d'autres sont encore peu ou non décrites et surtout leur rôle dans la physiopathologie est souvent inconnu. Nous avons modélisé un variant non décrit jusqu'alors de JAK2 retrouvé chez un patient (*JAK2H345L*) et l'avons caractérisé fonctionnellement. Le détail de l'étude est en Annexe dans l'Article n°1 « *Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls* ».

Dans un deuxième temps nous avons analysé les variants rares du gène de *CALR* retrouvés dans la cohorte de NMP de l'hôpital Saint-Louis. Nous montrons que dans plusieurs cas, un même malade présente plusieurs variants du gène dans le même clone ou différents clones, rendant difficiles l'interprétation des résultats de ces malades. Plus important, il est nécessaire de bien interpréter l'origine constitutionnelle ou somatique de ces variants et l'architecture clonale de ces malades afin d'adapter la conduite à tenir en terme thérapeutique (« *Pitfalls in CALR exon 9 mutation detection: A single-center experience in 571 positive patients »,* Article n°2 en Annexe)

Enfin, parmi les nombreuses mutations additionnelles retrouvées chez les patients NMP, les mutations du gène *CCND2* ont été découvertes récemment dans les cancers myéloïdes et sont rares et assez peu

décrites. Nous reportons ici dans la cohorte de NMP de l'hôpital Saint-Louis les variants de CCND2 isolées chez ces malades (« *CCND2 mutations are infrequent events in BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasm patients »,* Article n°3 en Annexe).

2ème partie : Etude des effets de l'IFN et de sa combinaison à l'As_2O_3 dans les NMP *JAK2V617F*

Notre équipe a précédemment démontré que le traitement des NMP par IFN entraine un effet cytoréducteur et une rémission complète hématologique et moléculaire chez les malades mutés *JAK2V617F*[252,253], résultat confirmé par d'autres[258]. Au niveau mécanisitique, ce constat révèle :

- Un effet anti-prolifératif de l'IFN déjà souligné précédemment,
- Une spécificité de l'IFN envers les cellules *JAK2V617F* par rapport aux cellules *JAK2 WT*

D'autre part, il est aujourd'hui clair que environ 20%-25% des malades atteints de NMP, mutés *JAK2V617F* et traités au long cours par IFN obtiennent des réponses moléculaires partielles ou même une absence totale de réponse à ce traitement[253]. Il semble donc nécessaire de mieux comprendre le mécanisme d'action de l'IFN afin de tenter d'améliorer son activité en le combinant à d'autres drogues.

Or, l'IFN est un inducteur transcriptionnel majeur de PML et l'implication de PML par la formation de CN-PML dans les voies finales d'activation de la sénescence a été montrée dans plusieurs modèles non hématopoïétiques[433,434] et hématopoïétiques[397] tel que vu précédemment (Figure 32). Nous supposons donc que l'amélioration de la formation de cette plateforme de CN-PML permettrait de potentialiser l'induction de sénescence induite par l'IFN seul. Un des moyens d'améliorer de manière importante l'agrégation des protéines PML et la formation de ces CN-PML est d'utiliser le trioxyde d'arsenic (As_2O_3), molécule bien connue et utilisée dans d'autres hémopathies[394,397].

Nous faisons donc l'hypothèse d'une potentielle synergie phénotypique et mécanistique de la combinaison de l'IFN au trioxyde d'arsenic dans les NMP mutées *JAK2V617F* par induction de sénescence impliquant la protéine PML (Figure 32).

Afin de comparer de manière claire les phénotypes sauvages (*WT*) et *V617F* de JAK2, nous disposons d'une lignée cellulaire isogénique, la lignée UT-7 précédemment décrite[435] qui exprime soit la forme sauvage de *JAK2* soit la forme mutée de *JAK2*. Les donnée générées seront confirmées sur d'autres lignées cellulaires mutées *JAK2* et présentant différentes copies du gène : HEL (8 copies de *JAK2V617F*), UKE (Homozygote pour *JAK2V617F*).

Enfin, nous disposons d'échantillons de malades atteints de NMP et mutés *JAK2V617F* sur le site de Saint-Louis grâce à une importante cohorte de malades suivis au long cours par des consultants locaux. La disponibilité de prélèvements primaires frais est donc un avantage et nous permet de travailler sur la fraction immature de ces cellules CD34+.

Nous disposons également à titre de comparaison de prélèvements issus de donneurs sains transmis par l'Etablissement français du Sang et qui nous servira à comparer les différents phénotypes relatifs à l'effet de l'IFN et de sa combinaison à l'As_2O_3.

Ces modèles nous permettront :

- D'évaluer la spécificité de ces drogues envers le génotype de JAK2
- D'évaluer l'éventuelle synergie d'action entre les deux drogues dans les NMP
- De décrypter le mécanisme d'action de l'IFN et de sa combinaison à l'As_2O_3 dans les NMP

- De proposer une approche préclinique de combinaison de traitement aux malades réfractaires aux médicaments actuellement utilisés dans le traitement des NMP.

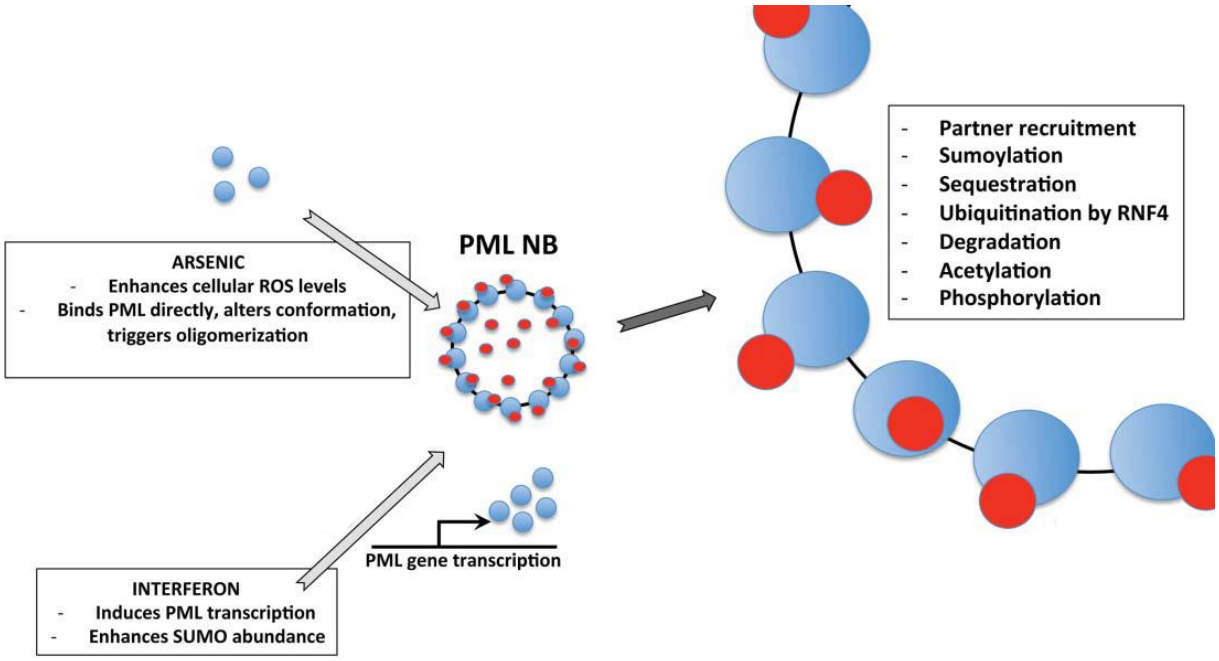


Figure 32 : Formation de CN-PML et fonctions en aval. Divers stimuli externes, en particulier la signalisation redox et interféron, convergent vers les CN, ce qui entraîne des fonctions pléiotropes dépendantes du contexte. L'arsenic favorise la formation des CN à la fois par la liaison directe à PML et par la génération de ROS. L'IFN augmente la transcription de PML. Ces deux médicaments améliorent le recrutement de partenaires sur les CN et favorisent les modifications post-traductionnelles *in situ* et l'activation de voies finales de la sénescence (*Sahin et al, Nucleus, 2014*).

Les résultats de ce travail en collaboration avec l'équipe de Jean-Luc Villeval et William Vainchenker à l'IGR ont été publié dans Journal of Experimental Medicine en annexe dans l'Article n°4 : « *JAK2V617F myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML*».

Troisième partie : Matériels et Méthodes

I Composés et plasmides

L'interféron alpha (Roferon) a été fourni par la pharmacie de l'hôpital Saint-Louis et dilué dans le milieu utilisé pour la culture cellulaire avant utilisation. Le trioxyde de d'arsenic (As_2O_3) a été acheté chez Sigma (01969) et dilué dans de l'eau avant utilisation. Le ruxolitinib a été acheté auprès de Selleckchem. Le vecteur pLVTHM-EF1α-eGFP (Addgene) a été utilisé pour former les plasmides pLVTHM-eGFP-sh1PML, pLVTHM-eGFP-sh2PML en sous-clonant les séquences respectives dans le vecteur, et ces constructions ont été validées par séquençage et fournis par Hugues de Thé. L'ADNc codant pour le JAK2 humain (*JAK2 WT* ou *JAKV617F*) a été cloné dans un vecteur lentiviral modifié pRRL, généré en remplaçant le promoteur PGK par le promoteur MND (régissant l'expression de JAK2) suivi du promoteur EF1a contrôlant l'expression de la eGFP (vecteur TMJ-JAK2) comme décrit précédemment[435].

II Lignées cellulaires et cellules primaires

Les lignes UT-7 *JAK2 WT* et *JAK2V617F* ont été générées par transduction lentivirale d'un TMJ-GFP-*JAK2 WT* ou *V617F* et fournies par Stéphane Giraudier[435]. Elles ont été cultivées dans du DMEM-10% FBS-1% Penicilline-Streptomycine et sont dépendantes de l'EPO (1 UI/ml). Les cellules HEL humaines (obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC)) ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF et des antibiotiques (mélange pénicilline-streptomycine 100 mg/ml) (Thermo Fisher Scientific). Des cellules CD34+ humaines ont été purifiées à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique de patients atteints de PMF et de PV à l'aide d'un kit (Miltenyi Biotec). Le sang de cordon et les cellules mononucléees du sang périphérique de donneurs sains ont été fournis par l'unité de thérapie cellulaire ou par l'unité d'aphérèse thérapeutique de l'hôpital Saint-Louis. Des cellules CD34+ humaines ont été cultivées dans le milieu StemSpan (Stemcell Technologies) en présence de TPO humaine recombinante de 20 ng/ml et de SCF humain (100 ng/ml) et d'IL-3 (20 ng/ml, Peprotech) pendant 10 jours pour la différenciation mégacaryocytaire. Les cellules cultivées ont été maintenues dans une atmosphère humidifiée à 37 °C avec 5 % de CO_2. Les lignées cellulaires ont été testées et déterminées comme étant exemptes de mycoplasmes.

III Essais de prolifération

Les cellules ont été ensemencées à $3x10^5$/ml dans une plaque de 96 puits en présence de chacune des drogues (IFN, As_2O_3 ou les deux) à différentes concentrations en triplicats. Les cellules ont été comptées à D1, D2 et D3 sur un compteur TC20 (Biorad) et la viabilité des cellules a été mesurée à l'aide de bleu trypan. La courbe dose-effet a été déterminée au 3e jour de culture dans chaque condition.

IV Immunofluorescence

Les cellules ont été placées sur des lames recouvertes de poly-L-lysine (Sigma), traitées avec 4% de PFA (Thermo fisher Scientific), perméabilisées avec 0,5% de Triton (Sigma) et marquées avec un anticorps monoclonal murin détectant la protéine PML humaine dilué au 1:5000 (2C'7) pendant la nuit, comme

indiqué précédemment[392]. Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-souris secondaire conjugué à l'Alexa Fluor 488 (Thermo fisher Scientific) dilué à 1:200 pendant 1 heure. Les lames ont été analysées au microscope confocal (Zeiss LSM 800) et des points correspondant aux CN-PML ont été comptés et l'intensité a été mesurée sur au moins 30 cellules réparties sur 5 à 6 champs avec le logiciel d'analyse d'images ZEN 2(Zeiss).

V Expériences de SA-β-Galactosidase

La coloration à la SA-β-Galactosidase a été réalisée *in vitro* sur des cellules de cytospin avec un kit de coloration de la sénescence β-Galactosidase (Cell Signaling 9860) en suivant les recommandations du fabricant sur les cellules à 10 jours de traitement. Le pourcentage de cellules colorées a été compté dans 20 champs dans chaque condition grâce à un microscope optique à la magnitude x40 (Olympus).

VI Quantification des transcriptions de gènes par PCR quantitative

L'ARN total a été isolé à partir de lignées cellulaires ou de cellules CD34+ primaires après 10 jours de culture. Les extractions ont été effectuées selon la méthode classique au Trizol, comme indiqué précédemment[436]. L'ADNc a été synthétisé en utilisant la transcriptase inverse SuperScript III (Invitrogen). La RT-PCR quantitative a été réalisée en utilisant le mélange universel de PCR rapide TaqMan (« Master Mix ») et le système de PCR en temps réel 7500 (Applied Biosystems). Les sondes et les amorces pour les tests TaqMan pour les gènes *PML*, *CDKN1A*, *PAI1*, *GDF15* et *GADD45b* ont été achetées chez Applied Biosystems. La TBP a été utilisée comme contrôle endogène pour calibrer la quantité d'ARNm cible.

VII Expériences de clonogénicité

Pour le test CFU-érythroïde (CFU-E) et myéloïde, 5 000 cellules CD34+ ont été ensemencées dans un milieu MethoCult contenant de l'IL-3, du SCF, du GM-CSF et de l'EPO (Stemcell Technologies, H4434) et cultivées en présence de PBS, d'IFN (200 UI/ml), d'As_2O_3 (10^{-7} M) ou des deux médicaments pendant 14 jours. Les colonies érythroïdes (CFU-E), granulocytaires (CFU-G), de monocytes-macrophages (CFU-M) et de granulocytes-monocytes (CFU-GM) ont été dénombrées le 14e jour conformément aux instructions du fabricant. Le nombre de colonies CFU-myéloïdes a été pris comme la somme des colonies CFU-G, CFU-M et CFU-GM. Les colonies érythroïdes et myéloïdes ont été prélevées le 14e jour de culture et les ADN en ont été extrait afin d'être séquencés.

VIII Génotypage

L'ADN génomique a été extrait des colonies comme indiqué précédemment. Brièvement, les colonies ont été resuspendues dans un mélange composé d'eau, de Tween 20 et de Protéinase K, chauffées à 56°C puis 72°C pendant une heure. Les allèles *WT* et *V617F* JAK2 ont été détectés par un test Taqman comprenant des amorces (5'-AAGCTTTCTCACAAGCATTTGGTTT-3') et des sondes (5'-AGGCATTAGAAAGCCTGTAGTTTTACTT-3') sens (fournies par Carole Conejero) et antisens (WT : 5'-HEX-TGTGTCTGTGGAG-TAMRA-3' ; V617F : 5'-6-FAM-TGTTTCTGTGGAG-TAMRA-3') utilisées pour amplifier un produit PCR de 88 pb. Des contrôles internes WT et V617F ont été introduits. Le génotypage a été effectué sur un Taqman 7500 (Applied biosystem).

IX Transductions virales

Les lignées cellulaires et les cellules CD34+ des patients atteints de NMP ont été transduites par des vecteurs lentiviraux comme suit : en bref, les vecteurs lentiviraux ont été introduits dans des cellules 293T en transfectant du pCMV-8.91, du pMD.G (Addgene) et le vecteur d'intérêt (pLVTHM-eGFP-sh1PML) pendant 2 jours. Le surnageant contenant le lentivirus a été concentré avec une solution de RetroX (Takara). Les cellules hématopoïétiques ont ensuite été spinoculées pendant 90 minutes avec le surnageant lentiviral, puis cultivées pendant 2 jours. Le troisième jour, le surnageant lentiviral a été retiré et le pourcentage de cellules transduites a été évalué par le pourcentage de cellules GFP-positives dans un BD FACS Canto II (Beckton-Dickinson). Les cellules ont ensuite été triées dans un BD FACS Aria III (Beckton-Dickinson).

X Analyse du cycle cellulaire et apoptose

La distribution du cycle cellulaire a été mesurée par l'incorporation du BrdU (Phase-Flow BioLegend 370706) et un marquage au DAPI par cytométrie de flux comme recommandé par le fabricant après 24h de traitement par IFN, As_2O_3 ou les deux traitements. L'apoptose cellulaire a été mesurée après marquage à l'Annexine V (Sony) et au 7-AAD (BD). En bref, 10^6 cellules ont été marquées avec 5 uL d'Annexin V et 5 uL de 7-AAD pendant 15 minutes à température ambiante, puis lavées et remises en suspension dans 400 ul de PBS avant d'être analysées dans le cytomètre (BD FACS Canto II, Beckton-Dickinson).

XI Western blot

Les cellules ont été lysées dans un tampon maison (PBS 1X-Tween 0,1% ; pH 7,0) complété par un cocktail d'inhibiteurs de protéase (100X, Thermo Fisher Scientific), d'inhibiteur de phosphatase (fluorure de sodium, 20mM, Sigma et Na_3VO_4, 1 mM, NEB) et d'inhibiteur d'histone désacétylase (butyrate de sodium, 5 mM, Sigma). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE dans des gels de polyacrylamide (Invitrogen) et transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare). Les membranes ont été immergées avec un anticorps monoclonal de lapin détectant PML humain dilué au 1:5000 décrit précédemment[392] et l'actine (Cell Signaling 8H10D10).

XII Échantillons de patients

Les échantillons de sang ont été prélevés à l'hôpital Saint-Louis (Paris, France), avec l'accord du Comité de Protection des Personnes (CPP) Ile de France IV-Institutional review board (accord du US Department of Health and Human Services n°IRB 00003835-Protocole 2015/59-NICB) et de la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (autorisation n°915663). Les consentements écrits et éclairés ont été obtenus conformément à la Déclaration d'Helsinki.

Les cellules CD34+ de sang de cordon ombilical et de donneurs adultes appariés sur l'âge avec les échantillons pathologiques (>50 ans) et provenant toutes deux de sujets sains ont été fournis respectivement par l'unité de thérapie cellulaire et par l'unité d'aphérèse thérapeutique de l'hôpital Saint-Louis.

XIII Analyses statistiques

Les données *in vitro* ont été analysées à l'aide de test t de Student et de l'ANOVA bidirectionnelle pour les tests clonogènes. Les barres d'erreur représentent la moyenne ± écarts-types moyens. Dans toutes les figures, *p<0,05, **p<0,01 , ***p<0,001, ****p<0,0001.

Quatrième partie : Résultats

I Expression différentielle de PML et statut JAK2

1. Expression totale de PML

Puisque l'on suspecte la voie PML d'être impliquée dans la spécificité d'action de l'IFN et de l'Arsenic dans les cellules JAK2 V617F par rapport aux cellules *JAK2 WT*, nous avons commencé par regarder l'expression dans la lignée isogénique UT-7 présentant la forme sauvage ou mutée de JAK2 mais également dans les lignées mutées *JAK2V617F* de manière endogène HEL et UKE.

Nous avons regardé dans un premier temps l'expression de PML au niveau transcriptionnel. On constate que le transcrit n'est pas différentiellement exprimé entre les lignées, et plus spécifiquement entre les UT-7 *JAK2 WT* ou V617F (WT : 117% vs V617F : 111%, p= ns, Figure 33A). Nous vérifions par ailleurs l'induction transcriptionnelle de PML par l'IFN (A 12h, WT : 419% vs V617F : 403%, p = ns, Figure 33B), similaire à l'induction par la combinaison à l'As_2O_3 (A 12h, WT : 439% vs V617F : 461%, p = ns, Figure 25D). Le traitement par As_2O_3 seul n'induit que peu l'ARNm de PML (Figure 33C).

Nous avons ensuite regardé l'expression protéique des isoformes de PML dans les lignées UT-7 *JAK2 WT* et JAK2 V617F. Le traitement par IFN induit bien toutes les isoformes protéiques de PML dans les deux lignées (A 24h, WT IFN: 20.3 vs WT: 4.2, $p < 0.05$, Figure 33E). L'As_2O_3 entraîne lui une dégradation précoce de PML, dès 30' de traitement (A 30', WT : 4.2 vs WT As_2O_3: 2.1 $p < 0.05$, Figure 33E) tel que déjà décrit précédemment. Son association à l'IFN ne permet pas de restaurer des taux normaux de PML, surtout à 2h de traitement (A 24h+2h, WT : 4.2 vs WT IFN+As_2O_3: 2.5, $p < 0.05$, Figure 33E). Nous ne voyons pas non plus de différence d'expression au niveau protéique entre les deux lignées selon le statut JAK2 (A 24h, WT IFN: 4.2 vs WT: 4.1, p= ns, Figure 33E).

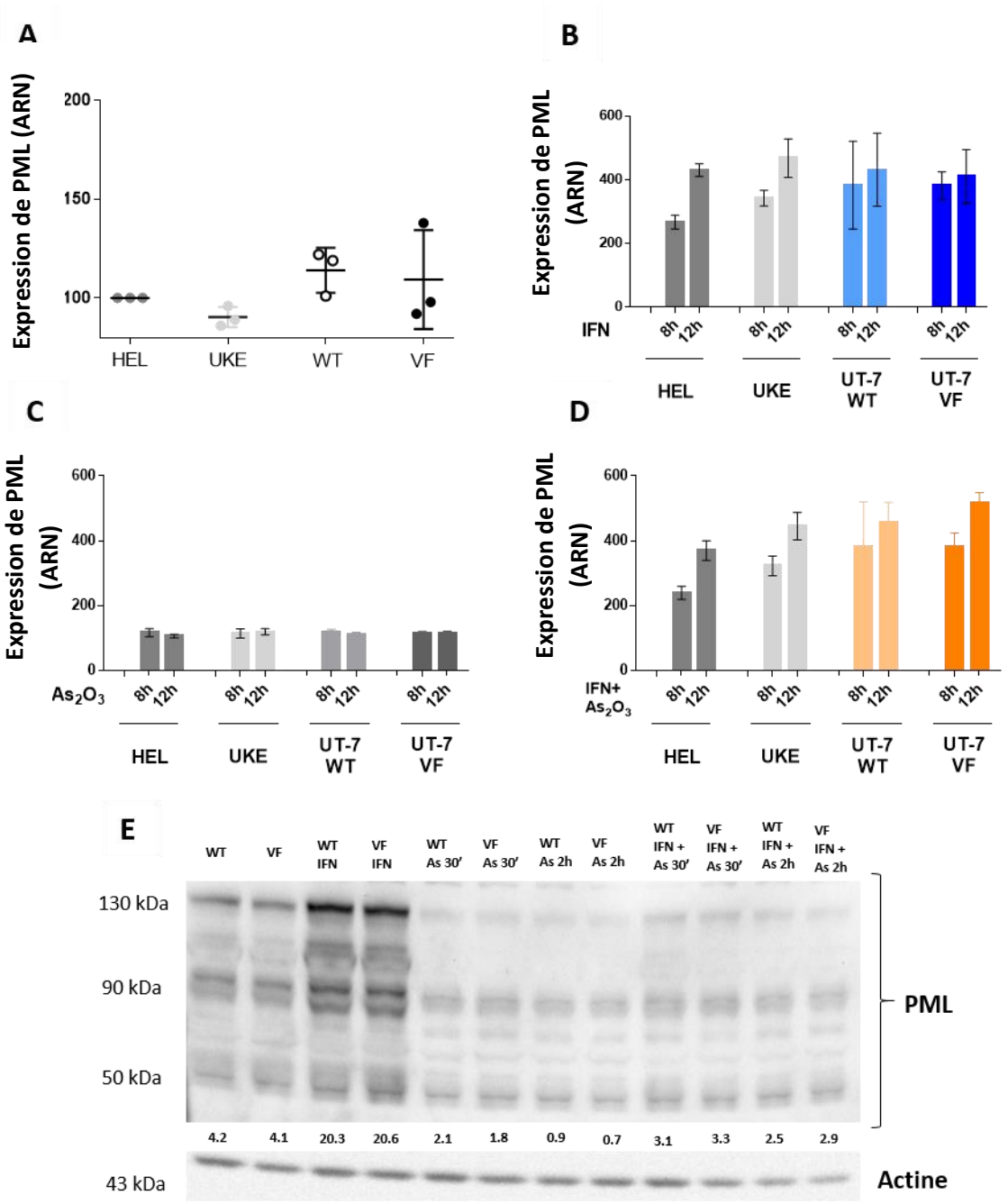


Figure 33 : Expression transcriptionnelle et protéique de PML dans les lignées myéloïdes HEL, UKE, UT-7 JAK2 WT (WT) et UT-7 *JAK2V617F* (V617F). (A) à l'état basal normalisé par rapport à l'expression de HEL et après 8 et 12h de traitement par (B) Interféron alpha (IFN 1000UI/mL), (C) As_2O_3 (0.5 uM) ou (D) la combinaison IFN+As_2O_3 aux doses indiquées. (E) Expression protéique de PML dans les lignées UT-7 JAK2 WT (WT) et UT-7 *JAK2V617F* (VF) non traitées ou sous interféron alpha (IFN 1000 UI/L 24h), trioxyde d'Arsenic (As, 0.5 uM) pendant 30' ou 2h ou la combinaison des deux drogues à 30' et 2h. Les différentes isoformes de PML sont présentes : PML I/II (130 kDa), PML III/IV (90 kDa), PML VII (50 kDa). Le ratio de chaque isoforme protéique de PML sur l'actine est représenté pour chaque condition de traitement.

2. Expression des CN-PML

2.1 Lignées cellulaires

Nous avons ensuite étudié l'expression basale des CN-PML dans ces deux mêmes lignées. Nous observons ici une expression plus importante de ces CN-PML en nombre et en intensité dans les cellules présentant la mutation *JAK2V617F* comparativement aux cellules non mutées pour le gène JAK2 (Nombre WT : 4.1 vs VF: 5.3, $p < 0.001$, Intensité : WT : 226 MFI vs 481 MFI, $p< 0.001$ Figure 34).

Lorsque l'on regarde ensuite l'effet des traitements sur la formation des CN-PML, on constate une augmentation drastique de leur nombre sous IFN (Nombre WT IFN: 10.8 vs VF IFN: 14.3, $p < 0.05$, Figure 34) et de leur intensité sous As_2O_3 (Intensité : WT : 981 MFI vs 1454 MFI, $p <0.05$, Figure 34). La combinaison des deux drogues potentialise la formation de ces corps nucléaires puisque l'on augmente leur nombre et leur intensité de manière beaucoup plus importante comparativement à chacune des deux drogues ajoutée isolément. Dans ce modèle, l'induction des corps nucléaires est plus importante dans les cellules *JAK2V617F* que dans les cellules WT (Nombre WT IFN+As_2O_3: 9.8 vs VF IFN+As_2O_3 : 18.6, $p< 0.0001$, Intensité : WT IFN+As_2O_3 : 1613 MFI vs VF IFN+As_2O_3: 3251 MFI, Figure 34).

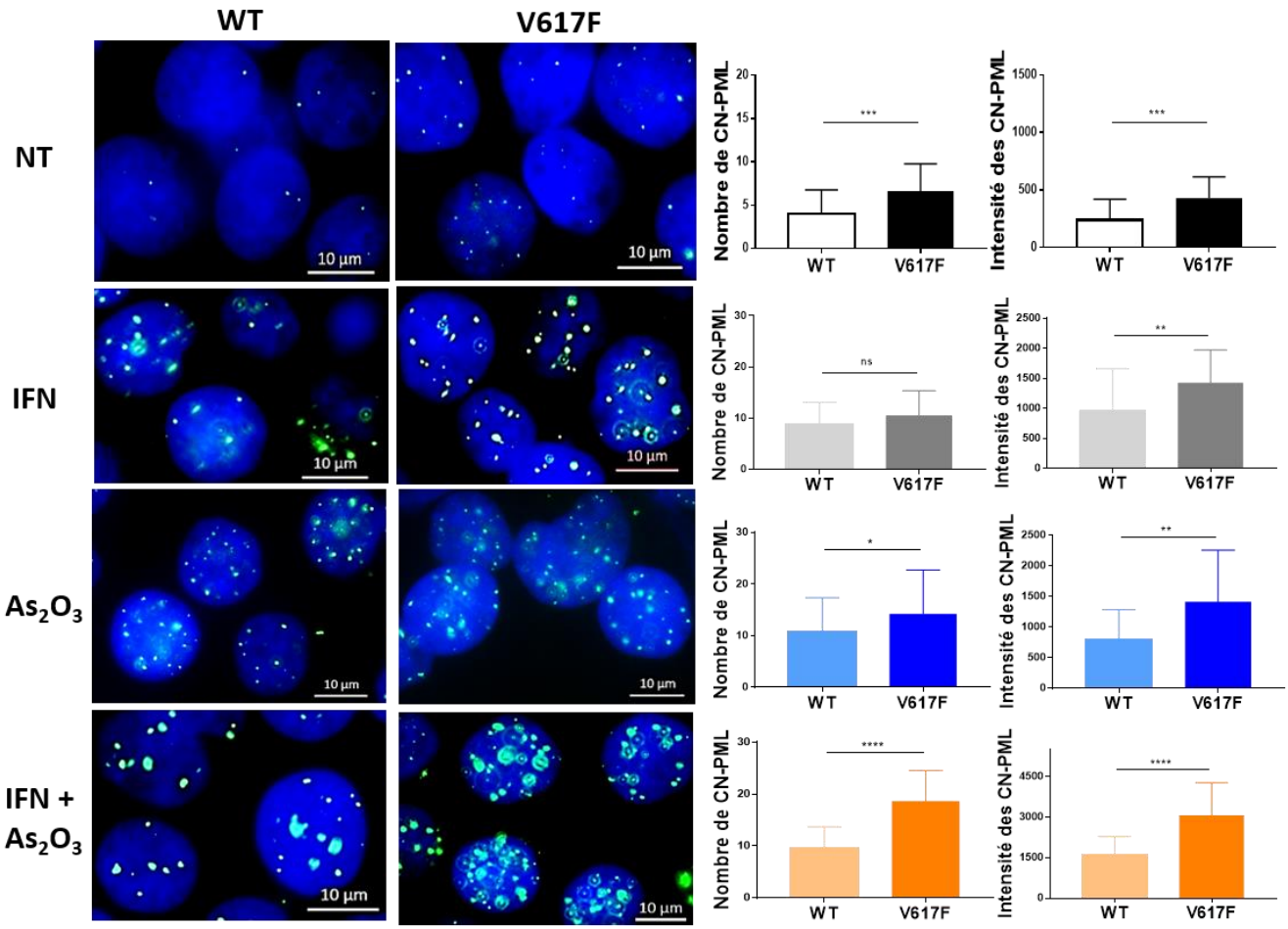


Figure 34 : Expression des CN-PML dans les lignées UT-7 JAK2 WT (UT-7 WT) et UT-7 *JAK2V617F* (V617F). Panel gauche : Immunofluorescences représentative de CN-PML dans les UT-7 JAK2 WT (WT) ou *JAK2V617F* (V617F) non traitées (NT) et après stimulation par IFN (1000 UI/mL, 24h), As_2O_3 (0.5 uM, 1h) ou la combinaison des deux (IFN+ As_2O_3) au temps indiqués. Panel de droite : Nombre et Intensité en MFI (Mean Fluorescence Intensity) résumés des CN-PML par cellule pour chaque lignée et en fonction du traitement (IFN : nuances de bleu, As_2O_3 : nuances de gris et IFN+ As_2O_3 : nuances d'orange). ns = non significatif, *p < 0.05, **p <0.01, ****p<0.0001.

La stimulation par l'IFN ou As_2O_3, ainsi que la potentialisation de la combinaison au niveau de la formation de CN-PML ont été confirmés sur la lignée HEL mutée *JAK2V617F* (Nombre NT: 9.9 vs IFN : 19.9, p <0.001, Intensité : NT : 576 MFI vs IFN+As_2O_3: 3201 MFI, Figure 35).

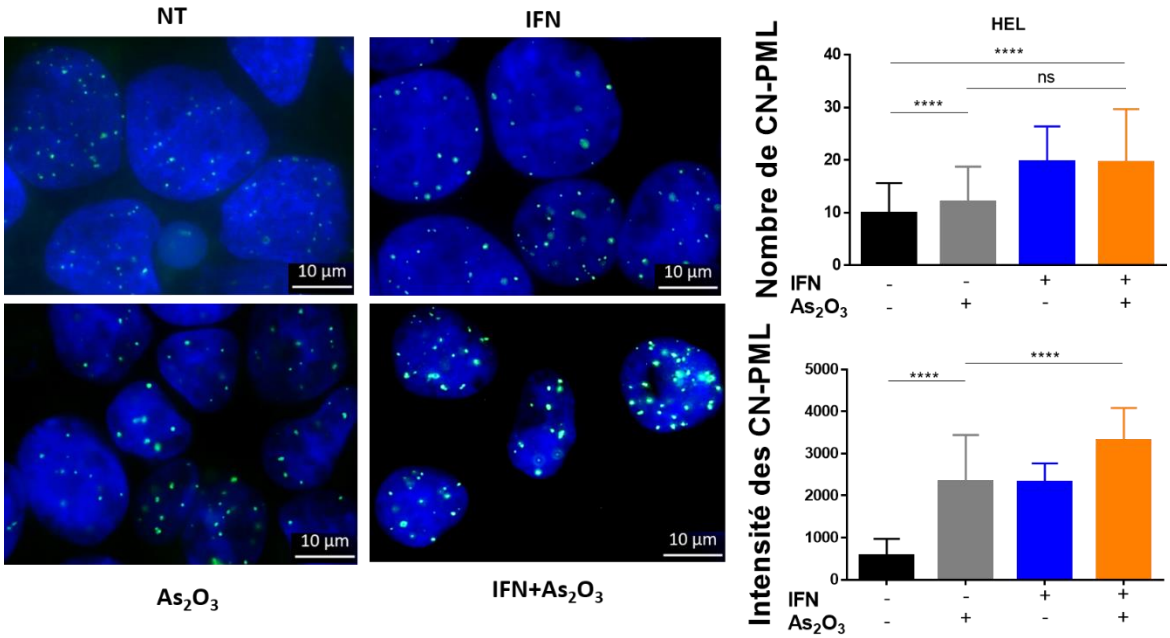


Figure 35 : Expression des CN-PML dans la lignée HEL *JAK2V617F*. Le nombre et l'intensité comparés des CN-PML par cellule sont représentés. Panel gauche : Immunofluorescences représentative de CN-PML dans les cellules HEL non traitées (NT) ou après stimulation par IFN (1000 UI/mL, 24h), As_2O_3 (0.5 uM, 1h) ou la combinaison des deux (IFN+As_2O_3) au temps indiqués. Panel de droite : Nombre et Intensité en MFI (Mean Fluorescence Intensity) résumés des CN-PML par cellule en fonction du traitement (IFN : bleu, As_2O_3 : gris et IFN+ As_2O_3 : orange).ns = non significatif, ****p <0.0001.

2.2 Cellules primaires CD34+

Il semblait alors important de confirmer ces résultats sur des cellules primaires de Néoplasie Myéloprolifératives mutées *JAK2V617F* et de les comparer à des contrôles sains. Nous avons sélectionné des malades présentant des fortes charges alléliques *JAK2V617F*.

Sur les trois échantillons de progéniteurs CD34+ isolés à partir de malades atteints de myélofibrose, tous présentaient par rapport aux contrôle sains au niveau basal un nombre (DS : 4.2 vs NMP : 11.0, p < 0.0001, Figure 36) et une intensité (DS : 197 MFI vs NMP : 978 MFI, p< 0.0001, Figure 36) de CN-PML par cellule CD34+ plus importante. De plus, le traitement par chacune des deux drogues et de manière plus évidente encore par la combinaison IFN+As_2O_3 permet de manière beaucoup plus importante la formation de CN-PML dans les cellules mutées *JAK2V617F* comparativement aux cellules *JAK2 WT* (Nombre : DS : 10.3 vs NMP : 16.1, p< 0.0001, Intensité : DS : 767 MFI vs NMP : 4057 MFI, Figure 36). Ceci corrobore donc les résultats retrouvés dans nos lignées.

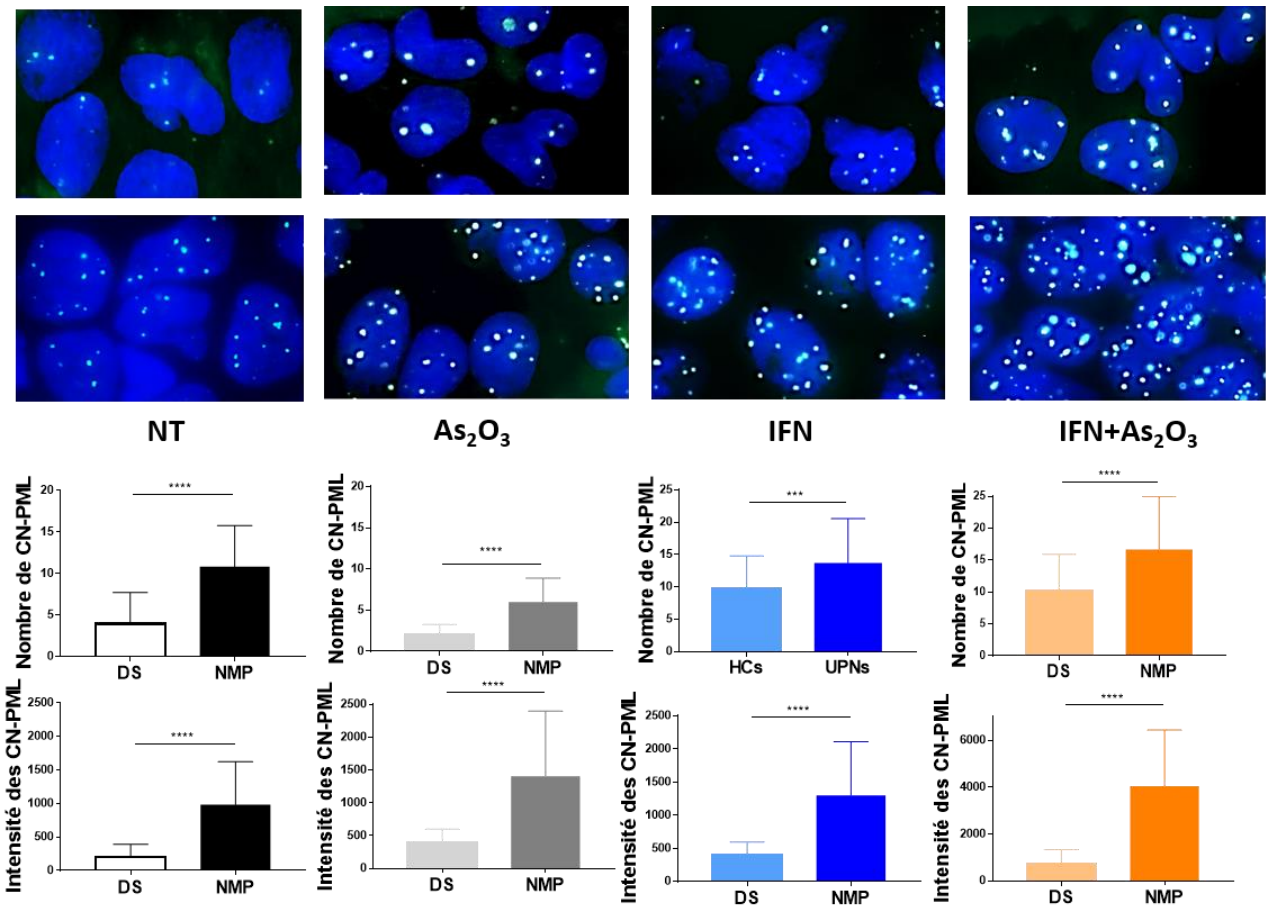


Figure 36 : Expression des CN-PML dans des CD34+ de donneurs sains (DS) ou de patients atteints de NMP et mutés *JAK2V617F*. Panel supérieur : Exemple de CN-PML dans les CD34+ d'un donneur sain et d'un patient atteint de NMP et présentant une forte charge allélique *JAK2V617F* au niveau basal (NT) et après stimulation par IFN 24h, As_2O_3 1h ou la combinaison des deux (IFN+ As_2O_3) au temps indiqués. Panel inférieur : Le nombre et l'intensité résumés des CN-PML par cellule de CD34+ de 3 donneurs sains et 3 NMPs. ***p <0.001, ****p <0.0001.

II Effets sur la prolifération et la clonogénicité

Ces différences d'expression au niveau basal et de réponse au traitement par IFN et l'As_2O_3 des CN-PML selon le statut mutationnel JAK2 nous fait poser l'hypothèse d'un effet phénotypique différent de ces drogues en fonction du génotype. Nous avons donc étudié l'effet de ces drogues seules et en association dans la lignée UT-7 *JAK2 WT* et JAK2 V617F ainsi que sur des progéniteurs CD34+ sains et de NMP sur la prolifération et la capacité à produire des colonies *in vitro*.

1. Lignées cellulaires

Sans surprise, l'IFN et l'As_2O_3 entrainent une inhibition de la prolifération au cours du temps des deux lignées isogéniques (A J4, taux de prolifération résiduel WT IFN: 39.7%, V617F: 20.2%, $p< 0.01$, Figure 37C). Lorsque l'on compare les effets en fonction du génotype JAK2, on constate sur la courbe effet-dose une concentration inhibitrice 50 (CI50) à l'As_2O_3 plus faible dans les cellules *JAK2V617F* par rapport aux cellules *JAK2 WT* (CI50 WT As_2O_3 : 1.28 uM vs CI50 V617F As_2O_3 : 0.48 uM, $p< 0.05$, Figure 37A), et cette différence est amplifiée par l'ajout de faibles doses d'IFN (CI50 WT As_2O_3: 0.51 uM vs CI50 V617F As_2O_3 : 0.04 uM , $p< 0.001$, Figure 37B). Enfin l'inhibition de prolifération des cellules mutées *JAK2V617F* est plus importante que celle des cellules *JAK2 WT* dans la condition combo (Taux de prolifération à J3 : WT : 53.7% vs V617F : 38.7%, $p< 0.01$, Figure 37B)

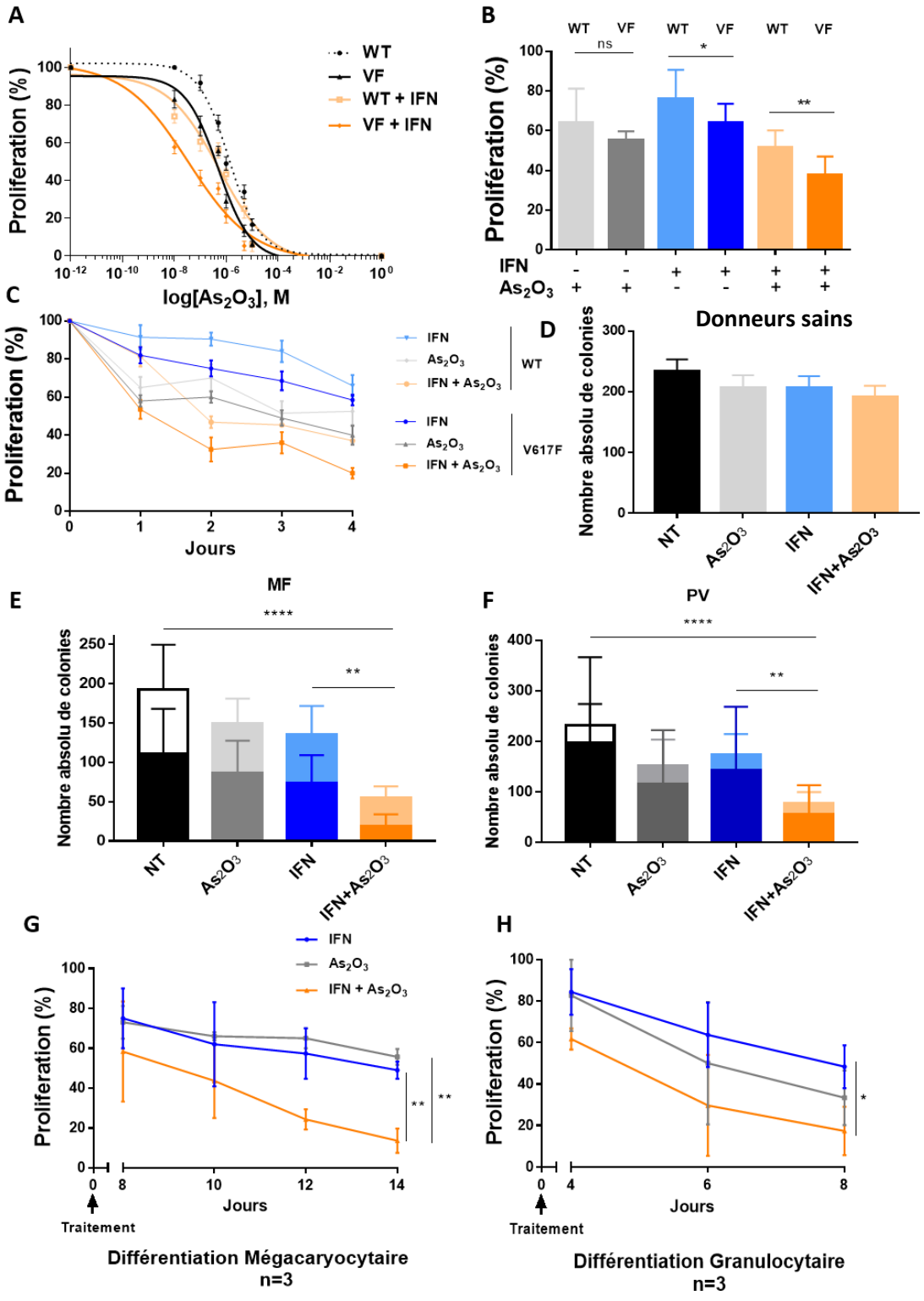

A
Proliferation (%)
WT
VF
WT + IFN
VF + IFN
log[As2O3], M
B
Prolifération (%)
WT VF WT VF WT VF
ns
*
**
IFN
As2O3
C
Proliferation (%)
IFN
As2O3
IFN + As2O3
WT
V617F
Jours
D
Donneurs sains
Nombre absolu de colonies
NT
As2O3
IFN
IFN+As2O3
E
MF
****
**
Nombre absolu de colonies
NT
As2O3
IFN
IFN+As2O3
F
PV
****
**
Nombre absolu de colonies
NT
As2O3
IFN
IFN+As2O3
G
IFN
As2O3
IFN + As2O3
Proliferation (%)
**
**
Jours
Traitement
Différentiation Mégacaryocytaire
n=3
H
Proliferation (%)
*
Jours
Traitement
Différentiation Granulocytaire
n=3

Figure 37 : Efficacité du traitement par IFN, As_2O_3 ou la combinaison des deux drogues sur les cellules *JAK2V617F*. (A) Courbe effet dose à l'As_2O_3 des UT-7 *JAK2 WT* ou *V617F* avec ou sans faibles doses d'IFN (200 UI/mL). (B) Taux de prolifération relatif au contrôle non traité des UT-7 JAK2 WT (WT, nuances claires) ou V617F (VF, nuances foncées) au 3e jour de culture sous IFN, As_2O_3 ou la combinaison des deux drogues aux doses décrites en (A). (C) Courbes de prolifération relatives au contrôle non traité des UT-7 JAK2 WT (WT, nuances claires) ou JAK2 V617F (V617F, nuances foncées) ou traitées par IFN (1000 UI/mL), As_2O_3 (0.5 uM) ou la combinaison IFN+As_2O_3 en fonction du temps sur 4 jours. Potentiel clonogénique de progéniteurs CD34+ issus de (D) donneurs sains (n=5) ou de patients NMP au stade (E) Myélofibrose (MF, n=10) et (F) Polyglobulie (PV, n=5) sans traitement (NT) ou traité par IFN (200 IU/mL, nuances de bleu), As_2O_3 (0.1 uM, nuances de gris) ou la combinaison IFN+As_2O_3 aux doses indiquées pendant 14 jours. Les colonies sauvages sont représentées en nuances clair et les colonies mutées en nuances foncées. Prolifération rapportée au contrôle non traité de CD34+ mutés *JAK2V617F* issus de trois patients MF sous traitement par IFN (bleu), As_2O_3 (gris) ou la combinaison des deux drogues (orange) en condition de différentiation (G) Mégacaryocytaire (présence de TPO, SCF et IL-3) pendant 14 jours et (H) Granulocytaire (présence de SCF, IL-3, IL-6, G-CSF et Flt3 ligand) pendant 8 jours. Le début de traitement est indiqué par la flèche pleine. ns = non significatif, *p < 0.05, **p <0.01, ****p <0.0001.

2. Cellules primaires CD34+

2.1 Clonogénicité

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'IFN et de l'As_2O_3 sur les cellules primaires. Nous avons dans un premier temps évalué la capacité des cellules primaires à produire des colonies *in vitro*. Nous avons isolé les progéniteurs CD34+ de cellules issues de sang périphérique de dix patients atteints de myélofibrose et mutées *JAK2V617F*, ainsi que de cinq polyglobulies de Vaquez.

Les traitements par IFN ou l'As_2O_3 seuls ont peu d'effet sur le potentiel clonogénique des cellules saines (Taux d'inhibition clonogénique sous IFN : 13%, sous As_2O_3 : 14%, Figure 37D), de même que l'association des deux (Taux d'inhibition clonogénique sous IFN+ As_2O_3 : 19%). Dans les échantillons de MF et de PV, on constate une diminution importante de la capacité des progéniteurs CD34+ à produire des colonies érythroïdes, particulièrement dans la condition combinée (Taux d'inhibition clonogénique sous IFN: 27% vs IFN+As_2O_3 : 73%, p <0.01 ; PV IFN : 18,8% vs IFN+As_2O_3 : 65%, p <0.01, Figure 37E et F). Après génotypage des colonies, nous observons que cette inhibition touche plus spécifiquement les colonies *JAK2V617F* par rapport aux colonies *JAK2 WT* (Taux d'inhibition clonogénique WT sous IFN: 24% vs IFN+As_2O_3 : 44% p < 0.05; V617F sous IFN : 24% vs IFN+As_2O_3 : 85%, p< 0.01, Figure 37E et F), confirmant encore la sensibilité plus important des cellules mutées pour l'association IFN+As_2O_3.

2.2 Prolifération en milieu liquide

Nous avons également regardé la prolifération des CD34+ en culture liquide sous différentes conditions de différentiation en culture liquide.

On constate ici que chaque traitement isolé diminue la prolifération des CD34+ (IFN à J14 en condition mégacaryocytaire : 57%, As_2O_3 : 61% ; IFN à J8 en condition granulocytaire : 59%, As2O3 : 40%, Figures 37G et H) mais que l'association IFN+As_2O_3 est toujours plus efficace à inhiber la prolifération cellulaire (à J14 en condition mégacaryocytaire : 17% vs IFN 57%, $p<0.01$, en condition granulocytaire : 19% vs IFN 59%, $p<0.05$, Figures 37G et H).

2.3 Effet sur les CSH de NMP

Afin de mesurer l'efficacité de notre combinaison de drogues sur les cellules souches leucémiques (CSL), nous avons trié des cellules souches à partir de cellules CD34+ issues de trois moelles de patients atteints de NMP selon le panel décrit par Notta et al[7] et séparé les cellules souches des progéniteurs hématopoïétiques. La stratégie de sélection des cellules est indiquée Figure 38A.

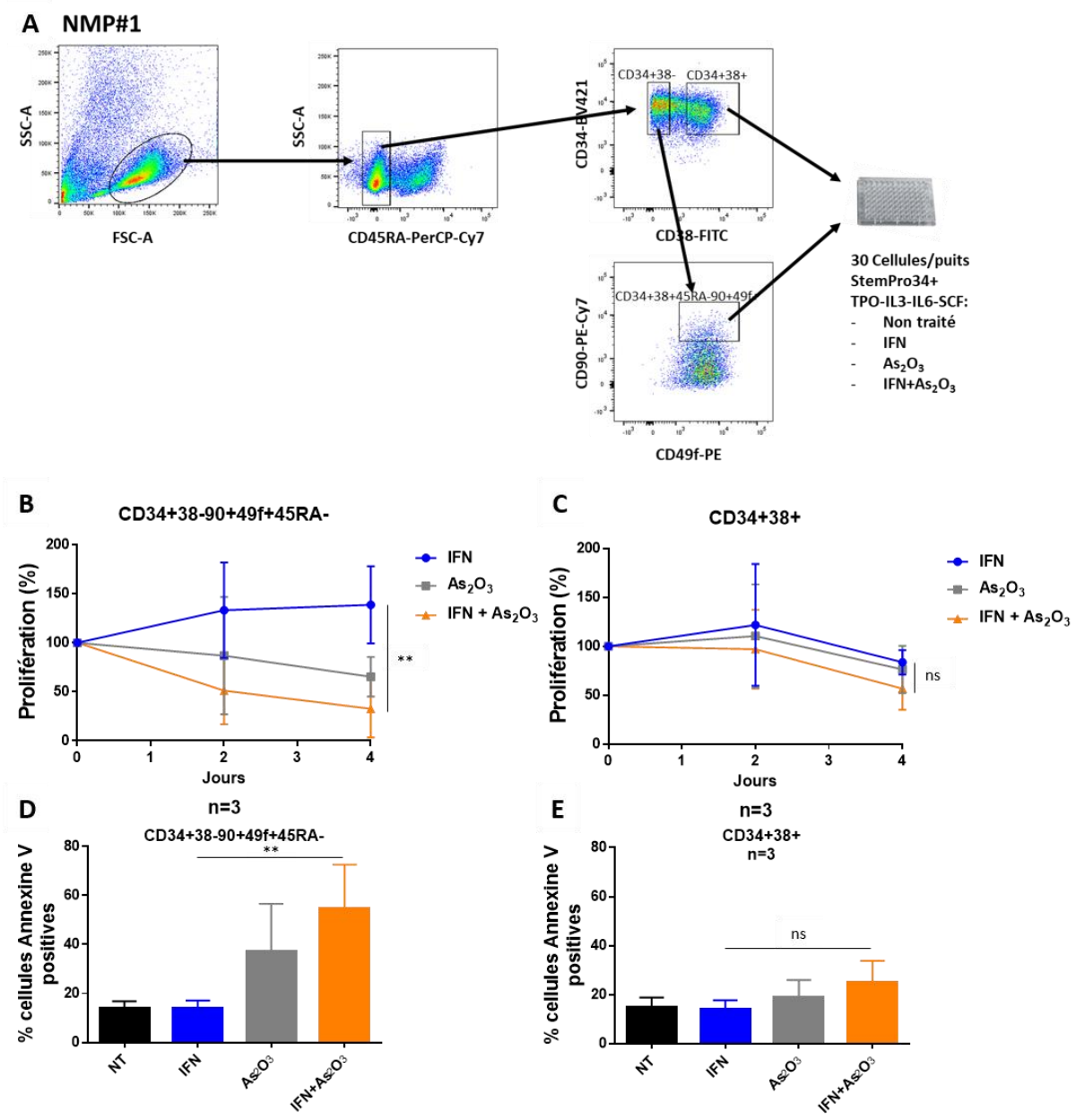


Figure 38 : Effets différentiels du traitement par IFN, As_2O_3 ou la combinaison des deux drogues sur les compartiments immatures *JAK2V617F.* (A) Stratégie de sélection des CSL et des progéniteurs hématopoïétiques en cytométrie en flux et protocole de mise en culture sous IFN (1000 UI/mL), As_2O_3 (0.5 uM) ou l'association des deux. Les cellules sont d'abord sélectionnées sur leur taille/structure, puis les cellules CD45RA négatives. Les cellules alors CD34+38+ considérées comme progénitrices sont isolées dans des puits de cultures tel qu'indiqué. Les cellules CD34+38- sont alors sélectionnées sur le CD90 et le CD49f et les cellules positives pour les deux marqueurs et considérées comme des CSH (*Notta et al, Science, 2016*) sont alors placées dans des puits de culture. Prolifération relative au contrôle non traité (B) de CSH et (C) Progéniteurs et Taux de cellules Annexine V-positives dans (D) les CSL et (E) les Progéniteurs issus de trois patients MF et mutés *JAK2V617F*. ns = non significatif, **p<0.01.

Dans le but de travailler quasi-exclusivement sur des cellules *JAK2V617F*, nous avons sélectionné des malades présentant une forte charge allélique *JAK2V617F*. Ainsi les effets observés sur les cellules souches leucémiques sont très différentes des effets sur les progéniteurs. L'IFN semble avoir un effet prolifératif sur les CSL (CD34+38-45RA-90+49f+) mais pas sur les progéniteurs (CD34+38+) (Prolifération des CSL sous IFN: 141% vs Progéniteurs : 92%, p <0.05, Figure 38B et C). Inversement, l'As_2O_3 et sa combinaison à l'IFN impacte beaucoup la prolifération des CSL par rapport à celle des progéniteurs (A J4, prolifération des CSL sous IFN+As_2O_3 : 31% vs Progéniteurs : 60%, p <0.05, Figure 36B et C). A l'inverse des progéniteurs qui semblent peu impactés, les CSL rentrent en apoptose rapidement, particulièrement sous la combinaison IFN+As_2O_3 (Taux d'Annexine V-positives dans les CSL sous IFN+As_2O_3 : 57% vs Progéniteurs : 23%, p < 0.05, Figure 38D et E).

III Mécanisme d'action cellulaire de l'IFN et de l'As_2O_3

1. Cycle cellulaire

Nous avons cherché à explorer l'origine de l'inhibition de la prolifération induite par l'IFN, l'As_2O_3 et amplifiée par la combinaison des drogues. Dans un premier temps nous avons exploré le cycle cellulaire des UT-7 *JAK2 WT* ou *JAK2V617F* après incorporation de BrdU.

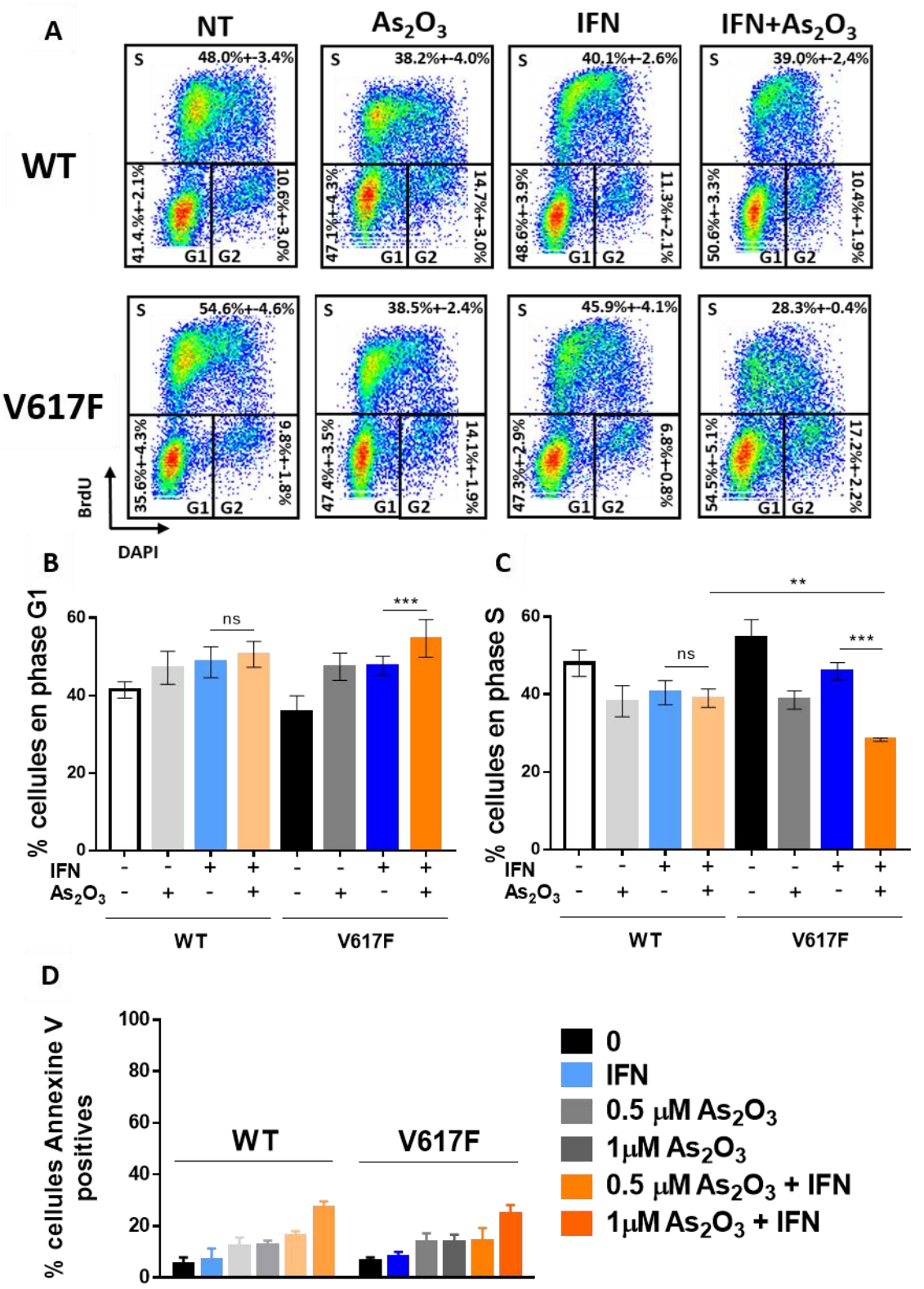


Figure 39 : Cycle cellulaire des UT-7 *JAK2 WT* (WT) ou *JAK2V617F* (V617F) traitée ou non par IFN, As_2O_3 ou IFN+As_2O_3 pendant 24h après marquage au BrdU/DAPI. (A) Scatterplots des différentes conditions décrites. Taux des cellules WT et V617F (B) en phase G1 et (C) en phase S en fonction du traitement. (D) Taux de cellules Annexine V-positives et IP-négatives dans les UT-7 JAK2 WT (WT) ou JAK2 V617F (V617F) 72h après traitement par IFN (1000 UI/mL), As_2O_3 aux doses indiquées ou IFN+As_2O_3. ns = non significatif, **p<0.01, ***p<0.001.

On observe à l'état basal plus de cellules en phase S dans la lignée *JAK2V617F* par rapport à la lignée sauvage (VF NT : 54.6%+-4.6% vs 48.0%+-3.4%, p<0.05, Figure 39A). Le traitement par IFN entraîne une augmentation du nombre de cellules en phase G1 et une chute du nombre de cellules en phase S, ceci dans les cellules mutées ou sauvages pour *JAK2* (V617F : 45.9+-4.1% vs WT : 40.1+-2.6%, p=ns, Figure 39B et C). Cette réduction des cellules en phase S est amplifiée par l'ajout d'As_2O_3 à l'IFN spécifiquement dans les cellules mutées *JAK2V617F* 24h après la mise sous traitement (V617F : 28.3+-0.4% vs WT : 39.0+-2.4%, p<0.01, Figure 39C). Ces résultats montrent que le traitement par IFN+As_2O_3 entraine un blocage du cycle cellulaire touchant davantage les cellules mutées *JAK2V617F* que les cellules sauvages.

2. Apoptose

Nous avons également étudié l'apoptose induite par les traitements dans les cellules sauvages ou mutées pour *JAK2.* Nous avons donc quantifié le taux de cellules Annexine V-positives et IP-négatives dans le modèle UT-7 *JAK2 WT* ou JAKV617F.

Le taux de cellules Annexine V-positives et négatives pour l'Iodure de Propidium (IP) n'augmente pas de manière significative sous IFN, As_2O_3 ou même leur combinaison (WT NT : 7% vs WT 0.5 uM As_2O_3+IFN : 11% à J3 post-traitement, p< 0.05 ; V617F NT : 8% vs V617F 0.5 uM As_2O_3+IFN : 11% à J3 post-traitement, p=ns, Figure 39D) que ce soit dans les UT-7 *JAK2 WT* ou JAKV617F hormis à doses suprathérapeutiques d'As_2O_3 dans le milieu (WT NT : 7% vs WT 1 uM As_2O_3+IFN : 18% à J3 post-traitement, p< 0.05, V617F NT : 8% vs V617F 1 uM As_2O_3+IFN : 19% à J3 post-traitement, p=ns, Figure 39D). L'inhibition de la prolifération observée sous IFN+As_2O_3 ne passe donc pas par un mécanisme pro-apoptotique.

3. Induction de Sénescence cellulaire

3.1 Lignées cellulaires

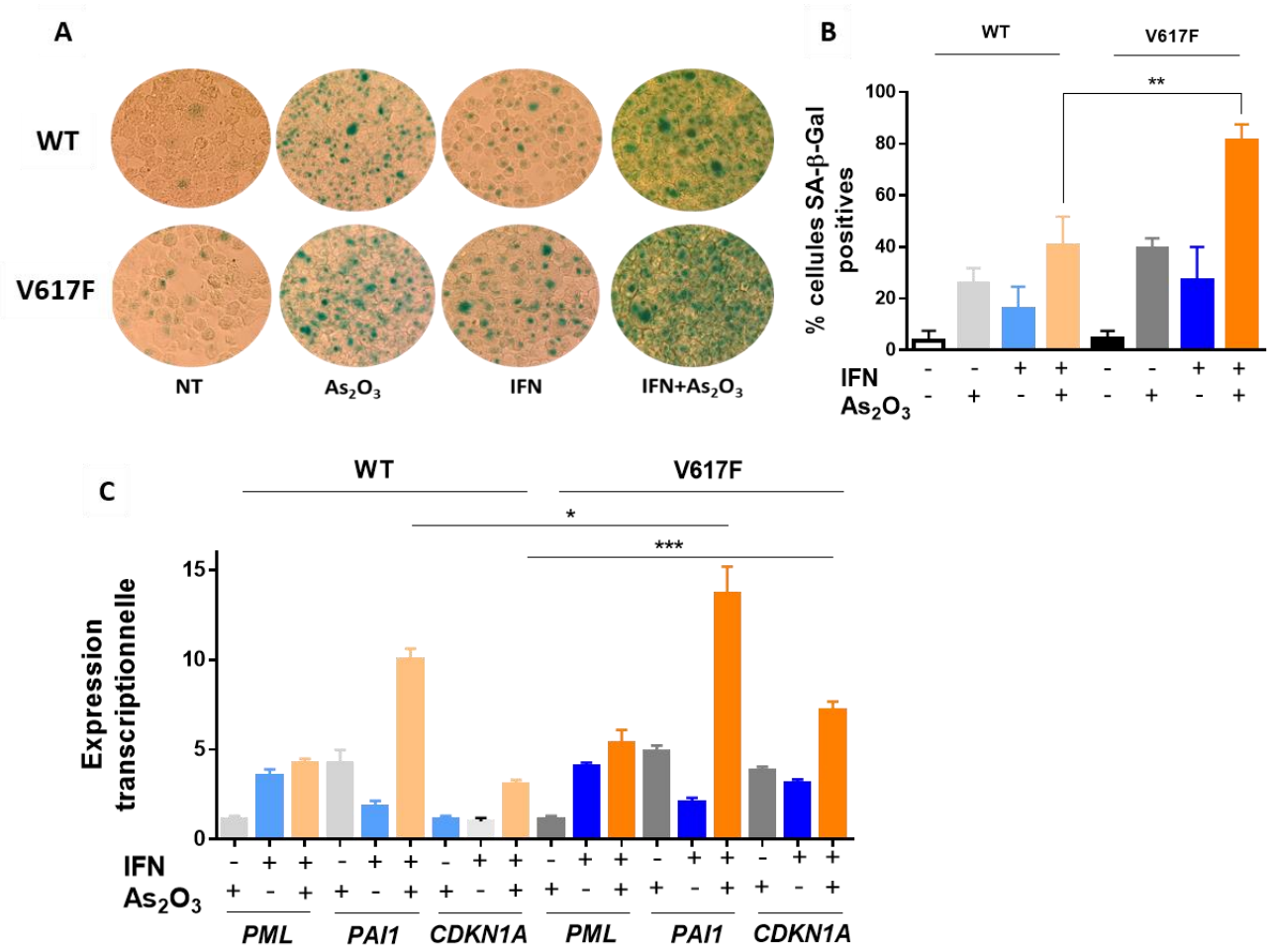
Pour continuer dans l'exploration du mécanisme d'action de ces drogues, nous avons ensuite fait l'hypothèse d'une induction de sénescence compte tenu des données obtenues sur PML et le blocage du cycle cellulaire observé sur la lignée UT-7. En l'absence d'apoptose significative, nous avons donc regardé des marqueurs de sénescence en commençant par la mise en évidence de la β-Galactosidase associée à la sénescence ou SA-β-Gal dans le modèle UT-7 muté ou non pour *JAK2V617F*.

On observe après marquage des cellules à la SA-β-Gal que non seulement l'As_2O_3 mais également l'IFN induisent de la sénescence après 7 jours de traitement (IFN : WT= 16% vs V617F= 27%, p< 0.05 ; As_2O_3 : WT= 25.6% vs V617F= 39.3%, p=ns, Figure 40A et B). Lorsque l'on regarde la combinaison IFN+As_2O_3, le taux de cellules SA-β-Gal-positives augmente de manière plus importante et surtout dans les cellules mutées *JAK2V617F* par rapport aux cellules sauvages (IFN+As_2O_3 : WT= 41% vs V617F= 81%, p< 0.01, Figure 40B).

Pour confirmer l'induction de sénescence amplifiée par l'association des deux traitements, et puisque nous suspectons PML d'être impliqué dans ce processus par la formation de CN-PML, nous avons exploré le profil d'expression des gènes induits lors de de la sénescence impliquant PML. Nous avons

donc quantifié le taux de transcrits de *PML*, *CDKN2A, PAI-1* dans les cellules *JAK2 WT* ou V617F selon les mêmes conditions que décrites ci-dessus.

On observe sans surprise une induction transcriptionnelle de PML sous IFN sans différence d'induction entre les deux lignées (IFN : WT= 3.5+-0.23 vs V617F= 4.07+-0.12, p = ns) mais pas sous As_2O_3 (As_2O_3 : WT= 1.1+-0.12, p=ns ; V617F= 1.1+-0.12, p=ns, Figure 40C). Lorsque l'on regarde l'effet de la combinaison IFN+As_2O_3 sur l'induction des gènes associés à la sénescence, on constate une induction importante de *PAI-1* (IFN+ As_2O_3 : WT= 10+-0.36, p<0.001 ; V617F= 13.7+-0.88, p<0.05) et de *CDKN1A* (IFN+As_2O_3 : WT= 3.07+-0.14, p<0.001 ; V617F= 7.1+-0.48, p<0.001). Cette induction de gènes pro-sénescents est toujours plus importante dans les cellules mutées *JAK2V617F* (Figure 40C).



<u>Figure 40</u> : Le traitement par IFN+ As_2O_3 induit la sénescence des cellules UT-7 *JAK2V617F*. (A) Cytospin de cellules UT-7 non traitées (NT) ou traitées 7 jours par IFN (1000 UI/mL), As_2O_3 (0.25 uM) ou la combinaison des deux drogues et marquées par coloration la SA-β-Galactosidase. Le taux de cellules positives (vertes) a été calculé sur plus de vingt champs contenant 200 cellules par champ. (B) Taux de positivité à la SA-β-Galactosidase après marquage des cellules UT-7 JAK2 WT (WT) ou *JAK2V617F* (V617F) 7 jours après traitement par IFN (bleu, 1000 UI/mL), As_2O_3 (gris, 0.25 uM) ou la combinaison des deux drogues (orange). (C) Expression transcriptionnelle des gènes associés à la sénescence par rapport au contrôle non traité. L'expression transcriptionnelle des gènes associés à la sénescence PML-dépendante est représentée dans les lignées UT-7 JAK2 WT (WT) ou JAK2 V617F (V617F) après 7 jours de traitement par IFN, As_2O_3 ou l'association des deux. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Afin de confirmer ces résultats nous avons tenté de reproduire ces expériences sur des cellules primaires CD34+ de patients atteints de NMP et mutés *JAK2V617F* en sélectionnant des malades présentant une forte charge allélique ou issus de donneurs sains. Nous avons ainsi traité ces progéniteurs hématopoïétiques par la combinaison IFN+As_2O_3 pendant 10 jours en condition de différentiation mégacaryocytaire tel que décrit par Besancenot et al. et réalisé un marquage à la SA-β-Galactosidase et une quantification des gènes impliqués dans la sénescence dépendante de PML (*PML*, *CDKN1A*, *PAI-1*, *GDF15*, *GADD45b*).

Chez les donneurs sains, on constate en différentiation mégacaryocytaire et sans traitement un marquage très positif à la SA-β-Galactosidase (Figure 41B et D), montrant à une sénescence spontanée des mégacaryocytes tel que décrit précédemment[407]. Sous la combinaison IFN+As_2O_3, le taux de cellules SA-β-Gal n'est pas significativement plus élevé chez les trois sujets étudiés (NT= 51.3 ± 6.9% vs IFN+As_2O_3 = 62.3 ± 5.6%, p=ns, Figure 41B et D). Comme décrit par Besancenot et al., dans les mégacaryocytes de MF, il existe très peu de cellules SA-β-Gal positives spontanées (Figure 41A) après 10 jours de différentiation. Cependant, le traitement par IFN, As_2O_3 et surtout par l'association des deux restaure un taux élevé de SA-β-Gal dans ces cellules (NT= 6.7 ± 2.4 vs IFN+As_2O_3 = 43,33 ± 4,4, n=3, p< 0.01, Figure 41C) après 10 jours de traitement.

De la même manière que dans les cellules UT-7 mutées ou non pour *JAK2V617F*, on retrouve dans les mégacaryocytes de myélofibrose une augmentation importante de l'expression de PML même après 10 jours de traitement par IFN et IFN+As_2O_3 (IFN+As_2O_3 : 4,40 ± 0,52, p<0.001, Figure 41E), mais également des gènes impliqués dans la sénescence dépendante de PML. Cette induction est plus importante que lors du traitement par IFN seul, en particulier pour *PAI1* (IFN : 1,94 ± 0,22, IFN+As_2O_3 : 4,5 ± 0,44, p<0.001, Figure 33E), *CDKN1A* (IFN : 2.31 ± 0,29, IFN+As_2O_3 : 4.0 ± 0,38, p<0.01) et *GDF15* (IFN : 1,95 ± 0,19, IFN+As_2O_3 : 8.0 ± 1.4, p<0.01, Figure 41E).

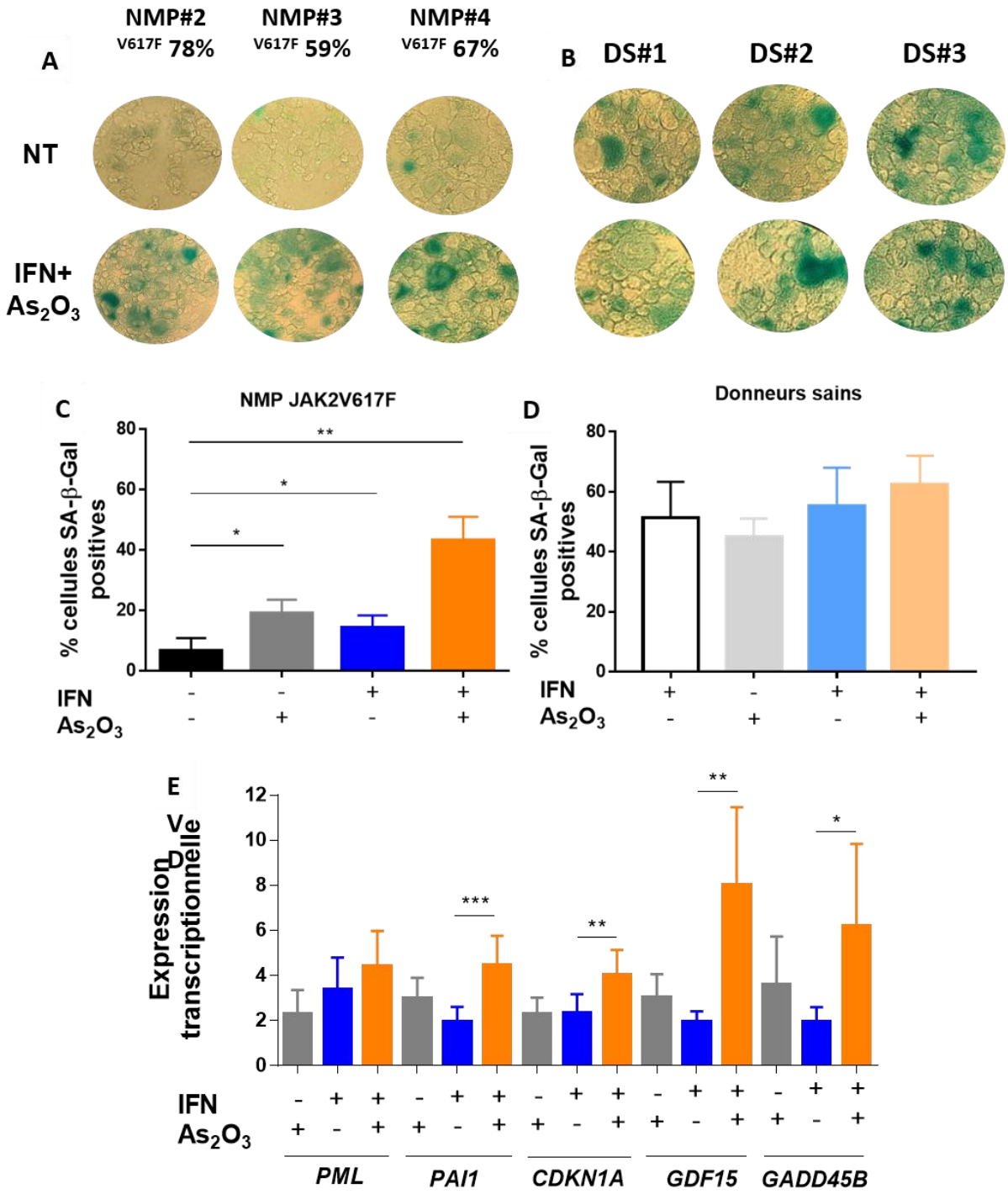


Figure 41 : Le traitement par IFN+ As_2O_3 induit la sénescence des progéniteurs de NMP mutés *JAK2V617F*. Cytospin de cellules CD34+ (A) issues de patients NMP (NMP) ou (B) de donneurs sains (DS) non traitées (NT) ou traitées 10 jours par la combinaison des deux drogues IFN+As_2O_3 et marquées par coloration à la SA-β-Galactosidase. Le taux de cellules positives (vertes) a été calculé sur au moins vingt champs contenant 200 cellules par champ. Taux de positivité à la SA-β-Galactosidase après marquage de progéniteurs CD34+ issus de (C) patients NMP mutés *JAK2V617F* (n=3) et (D) Donneurs sains (n=3) en différentiation mégacaryocytaire pendant 10 jours sans et avec traitement par IFN (bleu, 1000 UI/mL), As_2O_3 (gris, 0.25 uM) ou la combinaison des deux drogues (orange). (E) Expression transcriptionnelle dans les cellules UT-7 des gènes associés à la sénescence par rapport au contrôle non traité. L'expression transcriptionnelle des gènes associés à la sénescence PML-dépendante est représentée dans des progéniteurs CD34+ de patients NMP et mutés *JAK2V617F* après 10 jours de traitement par IFN, As_2O_3 ou l'association

IV Dépendance à PML

Nos résultats avec l'association IFN+As_2O_3 montrent une induction maximale de CN-PML dans les cellules *JAK2V617F*. Ceci est associé à une induction de PML au niveau transcriptionnel et protéique, une inhibition de la prolifération et un mécanisme de sénescence. Nous avons donc posé la question du caractère indispensable de PML dans la sénescence induite par le traitement par IFN+As_2O_3. Nous avons invalidé l'expression de PML et regardé l'impact sur l'activation du processus de sénescence dans des cellules mutées *JAK2V617F*.

1. Inactivation de PML

L'inactivation de PML par méthode d'ARN interférence (shPML) a été un échec sur le modèle UT-7 *JAK2 WT* ou *JAK2V617F* : les cellules transduites meurent entre J4 et J5 post transduction, probablement du manque de PML, en comparaison à un contrôle (shSCR, données non montrées). Nous avons donc choisi comme alternative de travailler sur des cellules uniquement *JAK2V617F* représentées par la lignée HEL. En effet, l'inactivation de PML est tolérée dans cette lignée.

A J2 post-transduction, l'ARN de PML est diminué d'environ 75% avec le sh1PML (Taux d'expression résiduel : shSCR : 100% vs sh1PML : 26.6%, $p< 0.0001$, Figure 42A) et de 80% avec le sh2PML (Taux d'expression résiduel : shSCR : 100% vs sh2PML : 20.0%, $p< 0.0001$, Figure 42A) dans la lignée HEL par rapport au shSCR (sh contrôle). Cette importante inhibition de PML est confirmée au niveau protéique à J4 post-transduction (Taux d'expression protéique résiduel : shSCR : 0.89 vs sh1PML 0.39, $p< 0.01$, Figure 42B). En termes de formation de CN-PML, on constate que cette forte diminution de l'expression de PML ne permet plus une formation efficace de ces corps, que ce soir avec l'un ou l'autre des deux sh (Figure 42C).

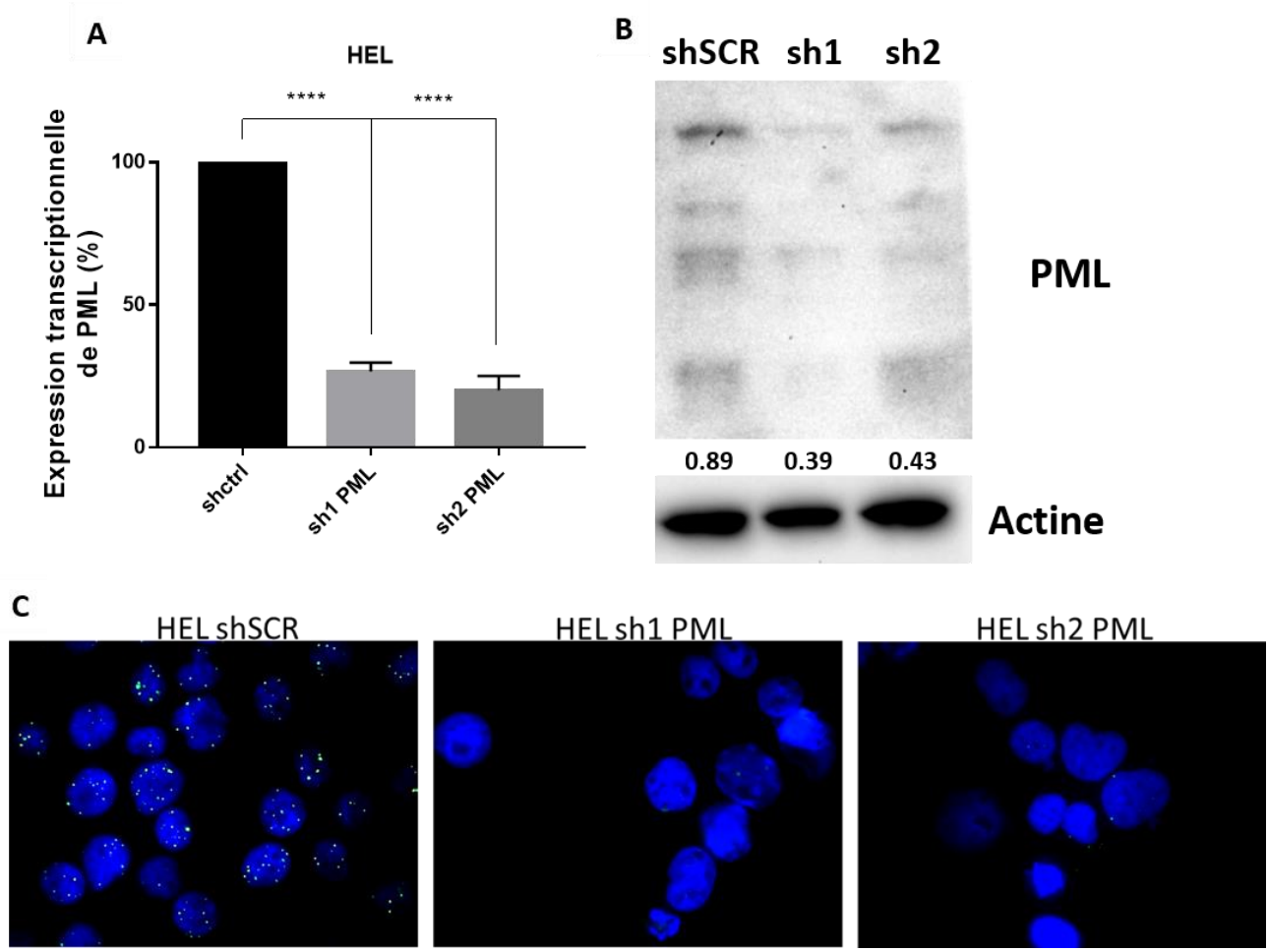


Figure 42 : Inhibition de l'expression de PML dans la lignée HEL. (A) Expression transcriptionnelle de PML à J2 post-transduction, (B) Western blot de PML à J4 post transduction. Les ratios PML/Actine incluant toutes les isoformes de PML sont indiqués et (C) Immunofluorescences montrant des CN-PML à J4 post transduction par le shSCR, sh1PML ou sh2PML. ****p< 0.0001.

2. Effets des drogues

2.1 Lignée cellulaire mutée JAK2V617F

Nous avons ensuite réalisé les mêmes expériences que décrites ci-dessus afin d'évaluer l'efficacité de l'IFN, de l'As_2O_3 et des deux drogues associées sur la prolifération cellulaire et l'induction de sénescence.

La prolifération sous IFN, As_2O_3 et IFN+As_2O_3 est bien diminuée dans des proportions attendues dans les cellules HEL exprimant PML après 10 jours de traitement (shSCR, IFN : 3723.3 vs NT : 13500, $p<0.0001$; IFN vs IFN+As_2O_3 : 583.3, $p<0.001$, Figure 43A). Dans les mêmes cellules pour lesquelles l'expression de PML est diminuée, le nombre de cellules est significativement plus haut sous IFN, As_2O_3 et surtout sous IFN+As_2O_3 par rapport aux cellules exprimant PML (IFN shSCR : 3723.3 vs IFN sh1PML :

7433.3, p<0.01 ; IFN+As_2O_3 shSCR : 583.3 vs IFN+As_2O_3 sh1PML : 3083.3, p<0.0001, Figures 35A). Ce résultat est confirmé avec le deuxième shPML utilisé (sh2PML, Figure 43A).

Nous avons étudié le cycle cellulaire à 24h de traitement dans ces différentes conditions et observé clairement une levée du blocage des cellules de la phase G1 vers la phase S dans le sh1PML en IFN seul et presque trois fois plus dans la condition IFN+As_2O_3 (IFN shSCR : 27.7+-2.4% vs IFN sh1PML : 43.2+-2.4%, p< 0.0001 ; IFN+As_2O_3 shSCR : 5.8+-0.4% vs IFN+As_2O_3 sh1PML : 14.5+-1.1%, p<0.0001, Figures 43B). Ces données montrent donc que le déficit en PML restaure la prolifération des cellules *JAK2V617F* sous IFN et même sa combinaison avec As_2O_3.

De même, le taux de cellules positives pour la SA-β-Gal après 10 jours de traitement dans les cellules HEL exprimant PML augmente comme attendu sous chaque traitement isolé et est amplifié par la combinaison (IFN : 26.7% vs IFN+As_2O_3 : 76.7%, p<0.001, Figure 43C). Ce taux de cellules SA-β-Gal-positives est significativement moins important dans les cellules HEL dont l'expression est diminuée pour PML, et ce dans chaque condition de traitement (IFN shSCR : 26.7% vs IFN sh1PML : 11.7%, p<0.0001 ; IFN+As_2O_3 shSCR : 76.7% vs IFN+As_2O_3 sh1PML : 23.3%, p<0.0001, Figure 43C), que ce soit avec l'un ou l'autre des sh (IFN shSCR : 26.7% vs IFN sh1PML : 12.3%, p<0.0001 ; IFN+As_2O_3 shSCR : 76.7% vs IFN+As_2O_3 sh1PML : 23.7%, p<0.0001, Figure 43C)

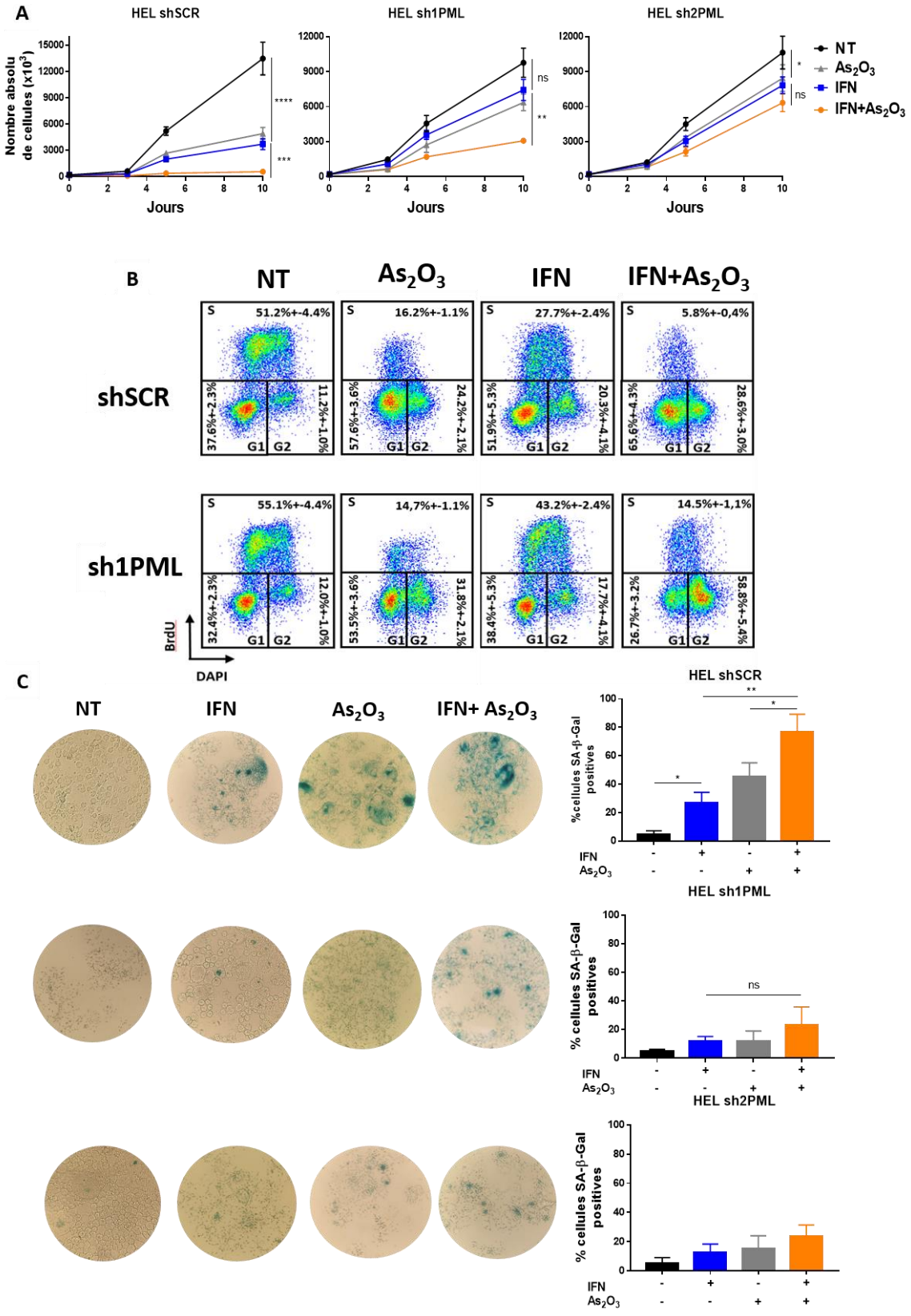

A
HEL shSCR
HEL sh1PML
HEL sh2PML
Nombre absolu de cellules (x10³)
Jours
NT
As2O3
IFN
IFN+As2O3
****
***
ns
**
*
B
NT
As2O3
IFN
IFN+As2O3
shSCR
sh1PML
51.2%+-4.4%
16.2%+-1.1%
27.7%+-2.4%
5.8%+-0,4%
37.6%+-2.3%
11.2%+-1.0%
57.6%+-3.6%
24.2%+-2.1%
51.9%+-5.3%
20.3%+-4.1%
65.6%+-4.3%
28.6%+-3.0%
55.1%+-4.4%
14,7%+-1.1%
43.2%+-2.4%
14.5%+-1,1%
32.4%+-2.3%
12.0%+-1.0%
53.5%+-3.6%
31.8%+-2.1%
38.4%+-5.3%
17.7%+-4.1%
26.7%+-3.2%
58.8%+-5.4%
S
G1
G2
BrdU
DAPI
C
NT
IFN
As2O3
IFN+ As2O3
HEL shSCR
HEL sh1PML
HEL sh2PML
% cellules SA-β-Gal positives
IFN
As2O3
ns

Figure 43 : Effets de l'IFN et de l'As_2O_3 sur des cellules HEL inactivées ou non pour PML. (A) Evolution du nombre et (B) Cycle cellulaire par marquage au BrdU/DAPI de cellules HEL inactivées (HEL sh1PML et sh2PML) ou non pour PML (HEL shSCR) non traitées (NT) ou traitées 10 jours par IFN (1000 UI/mL), As_2O_3 (0.25 uM) ou la combinaison des deux drogues. (C) Cytospin et taux de positivité à la SA-β-Galactosidase de cellules HEL inactivées (sh1PML et sh2PML) ou non (shSCR) pour PML, non traitées (NT) ou traitées 10 jours par IFN (bleu), As_2O_3 (gris) ou la combinaison des deux drogues IFN+As_2O_3 (orange) et marquées par coloration à la SA-β-Galactosidase. Le taux de cellules positives (vertes) a été calculé sur au moins vingt champs contenant 200 cellules par champ. ns = non significatif, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

2.2 Cellules primaires CD34+ de NMP

Afin de confirmer ces résultats, l'inactivation de PML a ensuite été réalisée sur des progéniteurs hématopoïétiques CD34+ de patients atteints de NMP par transduction lentivirale. Nous avons confirmé par RT-qPCR la diminution de l'expression de PML (Figure 44A) dans chaque échantillon.

En l'absence de tout traitement, la prolifération des cellules inactivées pour PML évolue selon une cinétique similaire aux cellules exprimant PML (A J12, Nombre de cellules shSCR : $30.9x10^5$ vs sh1PML : $32.1x10^5$, p = ns, Figure 44B). Cependant sous IFN+As_2O_3 les cellules CD34+ inactivées pour PML prolifèrent plus que les cellules exprimant PML (A J12, Nombre de cellules shSCR : $10.1x10^5$ vs sh1PML : $29.8x10^5$, p< 0.01, Figure 44B). Lorsque l'on regarde le profil de sénescence de ces cellules dont l'expression pour PML est diminuée et qu'on les compare aux cellules exprimant PML, on constate que ces cellules ont une perte du marquage à la SA-β-Galactosidase sous l'association IFN+As_2O_3 ce qui n'est pas le cas des cellules exprimant PML (shSCR IFN+As_2O_3 = 76.7% vs IFN+As_2O_3 =31.7%, p< 0.01, Figure 44C et D). Dans ces mêmes cellules CD34+ inactivées pour PML, après 10 jours de différentiation mégacaryocytaire, on observe une perte de l'induction des gènes associés à la sénescence (Taux d'induction transcriptionnel sous IFN+As_2O_3: *PML* : shSCR 7.5 vs shPML 1.18, p< 0.05 ; *CDKN1A* : shSCR : 7.35 vs shPML : 2.64, p< 0.05 ; *GDF15* : shSCR : 2.86 vs shPML : 0.21, p< 0.05, Figure 44E). Enfin, afin de d'évaluer l'impact de l'abolition de PML sur la capacité clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques de NMP, nous avons mis en culture semi-solide des CD34+ inactivés ou non pour PML de 4 patients au stade myélofibrose et mutés *JAK2V617F*. Nous observons dans un premier temps que le déficit en PML n'altère pas significativement le potentiel clonogénique des progéniteurs hématopoïétiques de NMP (Nombre de colonies sans traitement : shSCR : 71.5 vs shPML : 56.6, p = ns, Figure 44F), et développent une résistance au traitement par IFN+As_2O_3 alors que les cellules exprimant PML restent très sensibles à la combinaison comme vu précédemment (Nombre de colonies sous IFN+As_2O_3 : shSCR : 14.1 vs shPML : 39.5, p< 0.01, Figure 44F). Toutes ces données montrent que PML est indispensable aux effets de l'association IFN+As_2O_3 sur les progéniteurs hématopoïétiques de NMP.

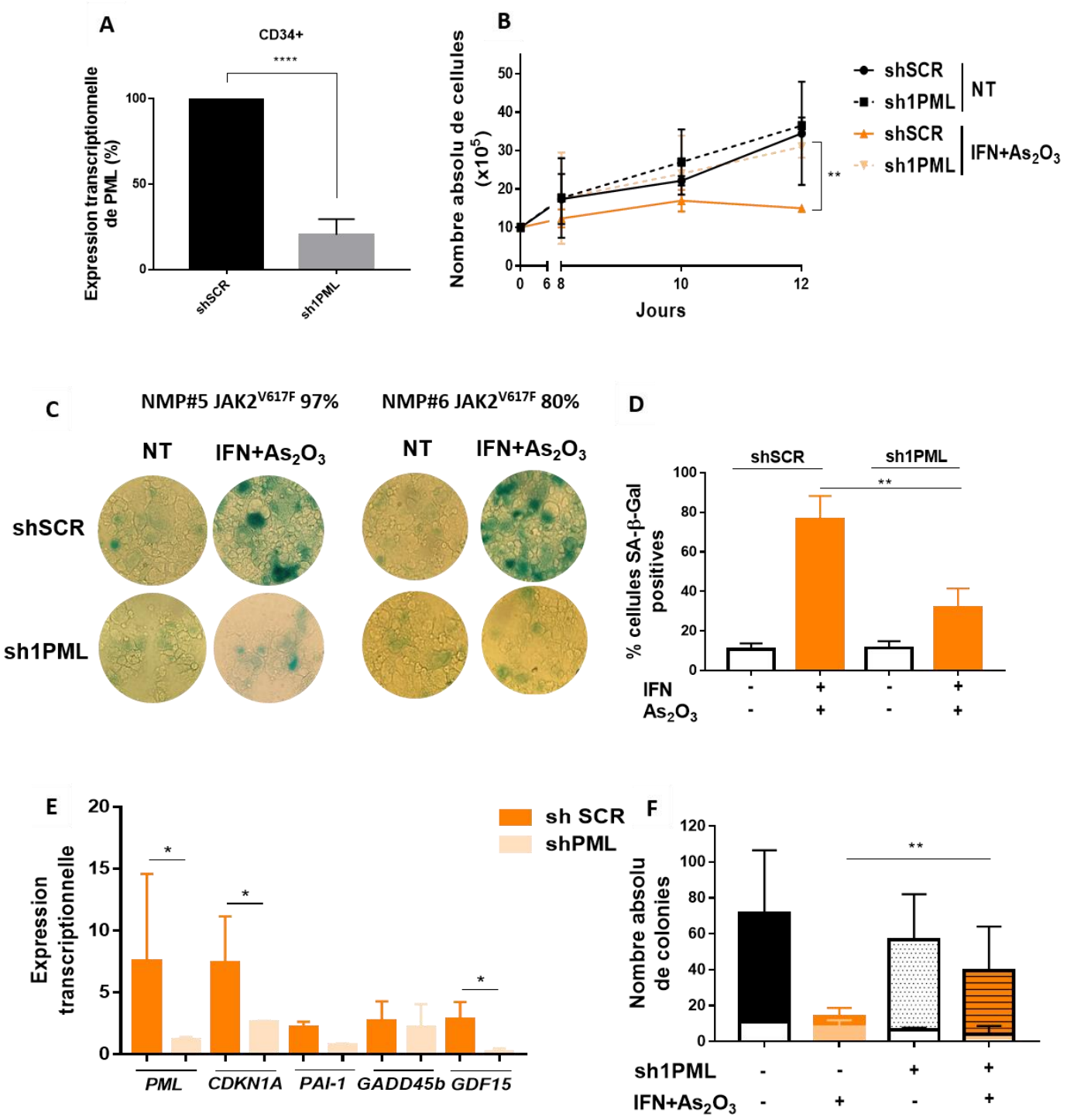


Figure 44 : L'efficacité du traitement par IFN+As_2O_3 sur les progéniteurs de patients NMP dépend de PML. (A) Expression transcriptionnelle de PML (n=3), (B) Prolifération des cellules non traitées (NT) ou traitées 12 jours par la combinaison IFN+As_2O_3 (n=3), (C) Cytospin (n=2) marquées par coloration à la SA-β-Galactosidase et (D) Taux de positivité à la SA-β-Galactosidase après marquage de progéniteurs CD34+ issus de patients NMP mutés *JAK2V617F* (n=3) en différentiation mégacaryocytaire pendant 10 jours sans et avec traitement par la combinaison IFN+As_2O_3 (orange), (E) Expression transcriptionnelle des gènes associés à la sénescence PML-dépendante rapportée au contrôle non traité après 10 jours de traitement par IFN+As_2O_3 et (F) Nombre absolu de colonies (n=4) cultivées traitées ou non pendant 14 jours par IFN+As_2O_3 de progéniteurs CD34+ de patients NMP mutés *JAK2V617F* transduits soit par un shPML (sh1PML) soit un sh contrôle (shSCR). *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001. Le taux de cellules positives (vertes) a été calculé sur au moins vingt champs contenant 200 cellules par champ.

DISCUSSION

Les NMP sont des hémopathies myéloïdes chroniques caractérisées par une évolution lente mais des complications à court terme et des évolutions à long terme qui altèrent la qualité de vie et sont à l'origine d'un pronostic péjoratif, notamment lors de l'évolution en myélofibrose ou de la transformation en leucémie aiguë myéloblastique[437]. Les traitements actuels ne permettent pas de guérir les malades, hormis la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Certains traitements médicamenteux anciens tels que le phosphore 32 ou les agents alkylants (Pipobroman) permettaient des réponses hématologiques mais souvent associées à des effets secondaires importants[287,438]. L'introduction de l'Hydroxyurée a permis d'augmenter les durées de réponses chez les malades et de diminuer les effets secondaires[231,235]. Ce n'est qu'avec l'introduction de l'Interféron alpha (surtout dans sa forme pegylée) que des réponses spectaculaires tant sur le plan clinique que biologique ont été constatées avec peu d'effets indésirables associés sur le moyen et long terme. En effet, l'observation d'un effet cytoréducteur associé plus tard à des réponses moléculaires importantes sur les clones déclenchant la maladie (*JAK2V617F* puis *CALR* mutés) a permis de faire émerger l'espoir d'éradiquer la maladie myéloprolifération par traitement médicamenteux[252,253,258,263].

Notre travail a permis d'étudier dans les NMP humains l'efficacité et le mécanisme d'action de deux drogues, l'IFN, déjà utilisé en thérapeutique dans ces hémopathies, et l'As2O3 dont l'efficacité thérapeutique est bien connue dans d'autres modèles de leucémies.

Nous avons voulu dans un premier temps vérifier l'efficacité de l'IFN dans nos modèles de NMP. Dans un deuxième temps, nous avons voulu mieux comprendre le mécanisme d'action expliquant la spécificité d'action sur le clone muté *JAK2V617F*. Nous avons tenté de répondre à cette question en testant l'effet de l'interféron sur des modèles de lignée cellulaires et des cellules primaires de patients mutés *JAK2V617F*. Nous vérifions d'abord dans des lignées cellulaires présentant la mutation que l'IFN entraine un effet anti-prolifératif dans les cellules hématopoïétiques[439]. Ensuite l'utilisation de la lignée isogénique UT-7, utile pour comparer l'effet entre les formes sauvages et mutées de JAK2 nous a permis de statuer quant à la spécificité d'action sur le type moléculaire et à l'implication même de la mutation *JAK2V617F* dans la sensibilité à l'IFN. Nous retrouvons bien ici un effet anti-prolifératif de la drogue plus important dans les cellules mutées que dans les cellules *JAK2* sauvages. Enfin, ces effets sont confirmés dans des progéniteurs primaires CD34+ issus de patients atteints de NMP, dans deux types de milieux différenciants différents. Cet effet antiprolifératif est complété par une inhibition de la capacité des cellules progénitrices primaires CD34+ de patients mutés *JAK2V617F* à former des colonies érythroïdes et myéloïdes *in vitro*. Nous prouvons également que cet effet est spécifique des cellules *JAK2V617F* par rapport aux cellules *JAK2 WT* chez les patients présentant une maladie au stade myélofibrose. Cet effet est moins visible dans les cellules progénitrices de patients polyglobuliques avec nos données probablement car le nombre de malades étudiés est insuffisant (n = 5), ou, étant donné que le compartiment des cellules souches mutées est amplifié chez les patients myélofibrotiques, l'IFN aurait un effet inhibiteur plus important dans les cellules qui cyclent de manière plus importante, ce qui n'est pas le cas des cellules souches mutées *JAK2V617F* de patients polyglobuliques. Cependant, les malades PV présentent des rémissions moléculaires importantes et parfois complètes[253,258]. Il est sans doute nécessaire de traiter plus longtemps pour voir un effet sur des cellules souches encore quiescentes à ce stade de la maladie myéloprolifération. D'autre part, nous avons investigué cet effet anticlonogénique dans les cellules CD34+ issues de donneurs sains et celui-ci est moins important que dans les progéniteurs de patients PV, appuyant le fait que le traitement par IFN cible les cellules malades de manière plus importante que les cellules saines. Dans tous les cas, si l'environnement myéloprolifératif tumoral différent entre stade PV et MF influe sur la mise en cycle

des CSL et donc sur la réponse au traitement des progéniteurs hématopoïétiques reste une question importante à laquelle nous ne répondons pas ici et qu'il convient d'explorer.

De manière à approfondir la caractérisation des effets de l'IFN, nous avons cherché à regarder l'effet de l'IFN sur des populations plus immatures telles que définies par Notta et al[7] parmi des cellules de malades atteints de myélofibrose. Nous avons ainsi séparé les cellules dites souches (CD34+38-45RA-90+49f+) des cellules progénitrices (CD34+38+). L'IFN semble promouvoir la prolifération des cellules souches tel que décrit précédemment[275,276] alors qu'il n'a pas d'effet sur les progéniteurs de malades NMP, même si variable entre les malades. Cette observation importante et non décrite dans ce contexte à ce jour mérite d'être répétée sur un nombre plus important de malades. Si cet événement est vrai, il pourrait signifier que l'IFN induit les cellules souches à cycler et entraînerait leur exhaustion au bout d'un certain temps de traitement. Il serait alors intéressant de regarder sur une période plus longue le comportement de ces cellules souches sous traitement par IFN sur des cellules humaines ce qui n'a été réalisé que dans des cellules murines par deux groupes[181,277].

En terme plus mécanistique, le mode d'action de l'IFN est encore inconnu. Les études montrant une activation du système immunitaire sont peu nombreuses[270–272] et aucune ne montre une spécificité envers le clone initiateur. Ce sont les expériences réalisées en l'absence du récepteur de l'IFN qui ont montré un véritable effet direct et intrinsèque sur les cellules souches hématopoïétiques[275]. L'effet de mise en cycle des CSH dormantes est compatible avec les effets que l'on observe sur des cellules souches *JAK2V617F* de NMP où l'on voit une prolifération induite par l'IFN. De plus, nos données in vitro montrent effectivement un effet antiprolifératif clair sur les lignées cellulaires et les progéniteurs non triés, en accord avec la littérature.

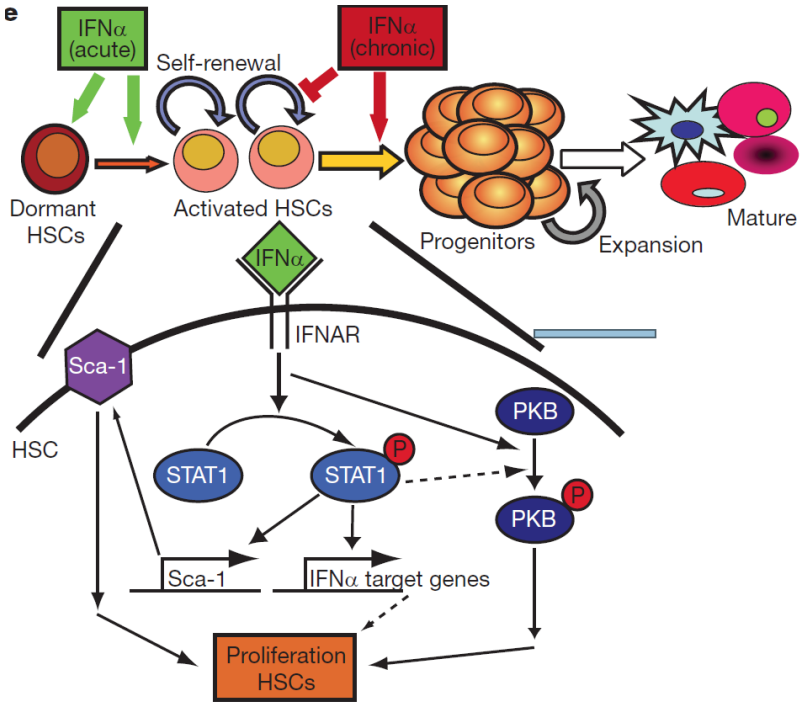


Figure 45 : Mécanismes moléculaires de l'IFN sur les cellules souches hématopoïétiques. Une exposition aiguë provoque une sortie de quiescence et une prolifération induite par l'activation de la voie IFNAR/STAT1 et la voie Akt et Sca-1. Une exposition chronique inhibe l'autorenouvellement des CSH et active l'expansion des progéniteurs, entrainant leur exhaustion (*d'après Essers et al, Nature, 2009*).

Cet effet ne passe pas par un mécanisme pro-apoptotique, même s'il a été montré que l'IFN peut induire l'apoptose dans certains modèles d'hémopathies[243,440], mais que les effets antiprolifératifs et pro-apoptotiques restent bien distincts[441]. Or, l'IFN est un inducteur transcriptionnel connu du gène *PML*[386], et PML est connu pour son rôle dans l'induction de sénescence par la formation de CN-PML au niveau souche[353,394]. Nous avons montré ici que l'IFN induit bien PML au niveau transcriptionnel et au niveau protéique dans nos modèles de NMP, mais cette expression n'est pas significativement plus importante dans les cellules mutées *JAK2V617F* par rapport aux cellules *JAK2 WT*. Ce résultat est en contradiction avec les résultats de notre équipe collaboratrice à l'Institut Gustave Roussy qui a étudié les effets de l'IFN sur PML dans un modèle de souris NMP et muté *JAK2V617F*. Ils retrouvent une surexpression protéique de PML dans la fraction Lin-négative des cellules murines *JAK2V617F* par rapport aux souris sauvages, chose que l'on ne retrouve pas dans la lignée humaine isogénique UT-7 *JAK2 WT* ou *JAK2V617F.* Cette différence observée peut être due à une expression faible de *JAK2V617F* dans cette lignée isogénique, insuffisante pour montrer des différences en termes de quantité de PML. Nous n'avons pas investigué si cette différence d'expression retrouvée est d'origine transcriptionnelle. Nous retrouvons par contre une formation de CN-PML plus importante dans les cellules mutées *JAK2V617F* et *JAK2 WT* sur les lignées cellulaires et surtout les cellules de patients NMP fortement mutés comparativement aux donneurs sains. Nous n'avons pas comparé les taux d'expression transcriptionnels et protéiques basaux de PML dans des progéniteurs humains normaux ou de patients NMP et mutés *JAK2V617F*. Cette analyse descriptive serait intéressante afin de mieux comparer aux résultats retrouvés chez la souris.

Plus important, nous montrons que cette formation de CN-PML est associée à une induction de sénescence plus importante dans les cellules *JAK2V617F* que dans les cellules *JAK2 WT* sous traitement par IFN.L'activation de ce processus a pu être montrée sur des cellules de lignées cellulaires mégacaryocytaires (UT-7) et érythoïdes (HEL) ainsi que sur des cellules primaires progénitrices issues de NMP ou de donneurs sains en condition de différentiation mégacaryocytaire. Il est important de noter que nos résultats confirment ceux de Besancenot et al[407] qui montraient que les mégacaryocytes tumoraux de patients myélofibrotiques ne rentraient pas en sénescence au cours du temps sous TPO alors que les mégacaryocytes sains arrêtent de proliférer spontanément après X cycles de division. Nos données valident ici que le traitement par IFN permet de restaurer un programme de sénescence dans les mégacaryocytes tumoraux mutés *JAK2V617F*.

La sénescence étant un phénomène difficile à définir, nous avons tout de même pu mettre en évidence plusieurs marqueurs différents qui nous ont permis de nous assurer de l'activation de ce processus : L'inhibition de la prolifération, le blocage du cycle cellulaire en phase G1, la positivité pour la SA-β-Gal, la formation de CN-PML, et un profil d'expression génique activé. D'un point de vue plus clinique, une sénescence IFN-induite plus importante dans des cellules *JAK2V617F* est à même d'expliquer les rémissions moléculaires observées chez les malades traitées au long cours par IFN[253,258]. Il est d'ailleurs intéressant de constater que la réduction de la charge allélique *JAK2V617F in vivo* chez les patients se fait de manière progressive et non drastique, compatible avec un épuisement du compartiment souche suite à une mise en cycle. Une question importante à laquelle il est important de répondre est de savoir si l'IFN induit une mise en cycle des CSH puis la sénescence dans les mêmes cellules, ou s'agit-il d'une action indépendante sur deux compartiments différents.

Il resterait donc à investiguer sur des prélèvements *ex vivo* avant mise sous IFN et au cours de la mise sous traitement l'induction de sénescence chez les patients qui diminuent leur charge allélique *JAK2V617F*. Ceci pourra se faire sur des progéniteurs hématopoïétiques car matériellement difficile sur des populations souches. Il sera intéressant de regarder l'effet de l'IFN dans les cellules progénitrices, ce qui n'a jamais été fait sur des cellules humaines. Les groupes de Mullally[277] et Vainchainker[181] ont

étudié les SLAM dans les modèles murins de NMP au cours du traitement par IFN et leurs résultats sont discordants. De plus ils n'ont pas regardé si les progéniteurs sous IFN entraient en sénescence. Dans les cellules humaines, il serait important de regarder si l'IFN induit les progéniteurs à entrer en cycle dans un premier temps puis un phénotype de sénescence. Ceci permettrait de confirmer les mécanismes à l'origine des rémissions induites au cours du traitement par IFN. Les cultures de progéniteurs CD34+ totaux ou de CD34+38+ ne semblent pas en faveur de cette hypothèse compte tenu de la décroissance constante de l pente de prolifération sous IFN au cours du temps.

Le traitement par As_2O_3 seul sur les différents modèles de NMP testés montre un phénotype de sénescence bien connu dont on peut suspecter être dépendant de PML. En effet l'agrégation des CN-PML observée après traitement est en accord avec la reformation des CN-PML normaux dans les modèles de LAP décrits dans la littérature[393,394]. L'As_2O_3 semble bien induire la formation des corps nucléaires de manière efficace dans les cellules myéloïdes avant de provoquer leur dégradation par SUMOylation et ubiquitination[362,372,392]. L'effet pro-sénescent induit par l'As_2O_3 est dans nos expériences toujours plus marqué que celui de l'IFN seul, reflétant l'importance de la formation des corps nucléaires pour l'activation du processus de sénescence. En termes d'inhibition clonogénique, aux doses relativement faibles utilisées (10^{-7} M), l'Arsenic, seul, montre une efficacité limitée sur les progéniteurs de NMP *JAK2V617F*. L'effet est encore plus limité qu'avec de très faibles doses d'interféron (200 UI/mL). Au niveau antiprolifératif, l'As_2O_3 se montre plus efficace sur la lignée *JAK2V617F* que sur la lignée *JAK2 WT*.

C'est surtout l'ajout d'Arsenic à l'IFN qui potentialise les effets de l'IFN seul. En effet lorsque l'on ajoute de faibles doses d'As_2O_3 à l'IFN, on augmente de manière importante la différence de CI50 entre les deux génotypes, élargissant en théorie la marge thérapeutique de ces molécules puisque les rendant plus spécifiques des cellules *JAK2V617F*. Au niveau clonogénique sur les cellules primaires, la combinaison inhibe de manière spectaculaire les colonies érythroïdes et myéloïdes et beaucoup plus spécifiquement les colonies mutées *JAK2V617F* par rapport aux colonies *JAK2 WT*, renforçant l'effet de l'IFN seul. Ces effets sont supérieurs en tous points au traitement par IFN seul, et ceci dans les NMP de type PV et MF.

Sur le plan mécanistique, nous montrons que la combinaison IFN+As2O3 s'avère extrêmement efficace sur la formation de CN-PML aussi bien dans les lignées cellulaires que dans les cellules primaires de patients NMP. Cette formation est beaucoup plus importante dans les cellules portant la mutation *JAK2V617F* que dans les cellules non mutées dans les deux modèles. De plus cette activation des CN-PML est associée à des marqueurs de sénescence beaucoup plus importants dans les cellules mutées. Cette activation différentielle selon le génotype *JAK2* permettrait d'expliquer les différences phénotypiques observées entre les cellules *JAK2 WT* et *JAK2V617F*.

Comment expliquer cette spécificité du traitement pour les cellules *JAK2V617F* ? L'activation basale des CN-PML plus importante dans les cellules *JAK2V617F* peut être expliquée par plusieurs hypothèses différentes. D'une part, les CN-PML sont connus pour être activés par différents stress dont les espèces réactives de l'oxygène (ROS)[356]. Or il a été montré que le taux de ROS est plus important dans les cellules *JAK2V617F* que dans les cellules *JAK2 WT*[442], ce que nous avons confirmé dans notre modèle isogénique UT-7 muté ou non (données non montrées). L'autre explication est l'activation de la voie JAK2/STAT5 qui a été reportée comme activant la formation des CN-PML[388,443]. En effet, la signalisation oncogénique dans notre contexte permettrait aux cellules d'avoir un « priming » ou une sensibilité plus importante aux signaux de sénescence induits par PML. Cette idée rejoint celle de l'activation de la sénescence par l'oncogène (OIS) modélisée par RAS oncogène[317] mais ici dans un modèle JAK2 oncogène. Il semble cependant que l'activation de la voie MAPK soit plus à même de conduire à un phénotype sénescent que l'activation JAK2/STAT5 dans les mégacaryocytes, même si cela reste

cependant à démontrer. De plus, et bien que cela n'ait pas formellement été étudié, les cellules mutées *JAK2V617F* ont une capacité de prolifération plus importante que les cellules *JAK2 WT*, avec des cellules qui cyclent plus[444]. L'équipe de Green a en effet également montré que ces cellules progénitrices *JAK2V617F* exprimaient dans le même temps un profil d'activation de la voie p53. Il serait intéressant de regarder si les différents acteurs de la sénescence mis en évidence ici sont également activés (PML, p21, PAI-1). Cependant. Afin de mettre la lumière sur le rôle *JAK2V617F* dans l'OIS, il serait intéressant d'étudier dans les différentes sous-populations de CSH et progéniteurs hématopoïétiques l'effet de *JAK2V617F* sur l'activation de la sénescence par rapport à des progéniteurs *JAK2 WT*. Cela pourra se faire également en comparant les voies d'activation de la sénescence par approche transcriptomique et protéomique. Nous disposons de données

Enfin, et pour tenter d'expliquer cette spécificité d'action de notre combinaison sur les cellules mutées Les modèles hématopoïétiques utilisant l'As_2O_3 en thérapie sont tous basés sur la dégradation de l'oncogène[394,396]. Il est donc légitime de poser la question de la dégradation de JAK2 oncogène par la combinaison IFN+As2O3 et médiée par les CN-PML et une modification post-traductionnelle de *JAK2V617F*. La SUMOylation et l'ubiquitination de JAK2 ont déjà été reportés[445,446]. Il a en plus été montré que la protéine *JAK2V617F* a des niveaux de SUMOylation plus important que JAK2 sauvage, ce qui est consistant avec une activation de CN-PML plus importante dans ces cellules. Il reste à démontrer que cette modification se produit dans les CN-PML, et que le traitement par IFN+As_2O_3 amplifie cette différence et aboutit à une dégradation plus importante de la *JAK2V617F* par rapport à *JAK2 WT*. Les données préliminaires que nous avons pu avoir sur la lignée UT-7 mutée ou non pour JAK2 ne montrent pas de profil de SUMOylation différents (collaboration avec Hugues de Thé, Valérie Lallemand, Omar Ferhi, données non montrées). De plus la quantification protéique de JAK2 dans ce même modèle montre une dégradation de JAK2 dans la lignée mutée à 72h mais pas 24h (données non montrées). L'interprétation de ces données est limitée par un défaut non négligeable de notre modèle qui est l'expression du JAK2 endogène des UT-7, forme sauvage interférant avec l'interprétation de ces résultats. Il serait intéressant de répéter ces expériences sur une lignée type HEL ou UKE après réparation de *JAK2V617F* en *JAK2 WT* par une approche CRISPR.

Une question importante qui doit se poser est celle du mécanisme moléculaire permettant l'activation d'une sénescence p21-dépendante à partir de l'activation des CN-PML. Plusieurs partenaires ont été décrits comme étant recrutés. En effet, l'activation des CN-PML permet le recrutement de partenaires comme p53. Une hypothèse simple serait que p53 serait activé dans les CN-PML après modification post-traductionnelle (acétylation ou phosphorylation) et activerait la transcription de p21. Il serait donc intéressant de regarder si comme il a déjà été montré si p53 interagit avec PML sous traitement par IFN+As_2O_3. Ceci serait possible par immunoprécipitation et/ou colocalisation en immunofluorescence. Enfin il est important de tester le caractère p53-dépendant de la sénescence induite par les drogues en inactivant p53 dans les progéniteurs CD34+ de NMP. En effet, il est surprenant d'observer que la sénescence physiologique des mégacaryocytes est TPO-dépendante mais ne fait pas intervenir p53 mais plutôt la voie p16[407]. Dans notre modèle où PML joue un rôle central, une sénescence p53-indépendante et activant directement Rb a été déjà décrite par l'équipe de Ferbeyre[447]. En effet, dans ce cas, PML permettrait le recrutement direct de Rb et E2F, promouvant l'arrêt du cycle en G1. Ces études ne montrent cependant pas si les inhibiteurs de CDK tel que p21 sont impliqués dans l'activation de Rb. Ceci est à confirmer par l'étude de l'interactome de PML sous IFN+As_2O_3 pour définir plus précisément les partenaires mis en jeu dans l'induction de sénescence.

Nous avons confirmé que PML est nécessaire à la sénescence induite par l'IFN+As_2O_3 dans les cellules *JAK2V617F* dans la lignée HEL et des progéniteurs CD34+ en condition de différentiation mégacaryocytaire. Or, dans ces conditions, les progéniteurs hématopoïétiques normaux rentrent

spontanément en sénescence. Il serait donc intéressant d'investiguer l'implication de PML dans les mécanismes à l'origine de cette sénescence TPO-dépendante. Ceci pourrait être réalisé par inhibition de PML dans des CD34+ sains mis en condition de différentiation mégacaryocytaire.

D'autre part, les expériences d'invalidation de PML en situation clonogénique montrent que la perte de sénescence induite par le traitement est associée à une perte de l'inhibition du potentiel clonogénique spécifique à la mutation *JAK2V617F*. Ce résultat important met en lien l'activation d'un processus de sénescence avec une propriété des cellules progénitrices.

Enfin, comme dans le cas de l'IFN seul, on peut se poser la question de la population hématopoïétique atteinte par ce processus de sénescence induit par la combinaison des drogues. Les résultats de clonogénicité et de différentiation en milieu liquide laissent supposer un ciblage des populations immatures beaucoup plus important avec cette combinaison. Lorsque l'on regarde ensuite les effets sur les populations souches vs progéniteurs, on constate que l'association est beaucoup plus toxique sur les cellules souches que sur les progéniteurs. En effet, l'apoptose induite par l'association n'existe pas dans la population progénitrice mais uniquement une inhibition de prolifération. Il semble que cette apoptose soit liée à l'As_2O_3 puisque son ajout seul fait rentrer les cellules souches en apoptose. Cette toxicité sur les cellules souches a déjà été montrée précédemment dans d'autres modèles[353,395,448]. La combinaison IFN+As_2O_3 entrainerait l'apoptose précoce des cellules leucémiques de phénotype souche et une sénescence des cellules progénitrices leucémiques. Il est cependant important :

- De confirmer sur une série plus large de prélèvements de NMP,
- De vérifier l'absence de toxicité sur des populations souches non mutées.

Nous ne retrouvons enfin pas les effets pro-apoptotiques décrits par Hasan et al, dans les SLAM de souris trois jours après traitement *in vivo* par IFN seul, mais une tendance prolifératives des cellules souches humaines JAK2 mutés. Cette apoptose n'était cependant retrouvée que dans les CSH et progéniteurs spléniques et non médullaires. De plus, Mullally et al ne retrouvent pas non plus d'effet pro-apoptotique dans cette population immature, mais un cycling plus important de ces cellules, en accord avec nos résultats.

L'équipe de Jean-Luc Villeval à l'Institut Gustave Roussy avec qui nous avons collaboré dans ce travail a pu explorer l'effet de l'ajout d'As_2O_3 à l'IFN *in vivo* dans un modèle murin greffe compétitive de cellules *JAK2V617F* et *JAK2 WT*. Leurs résultats montrent améliorent la réponse hématologique des souris JAK2 comparé à l'IFN seul et retrouvent également un ciblage spécifique des cellules *JAK2V617F* dans tous les compartiments myéloïdes et même érythroïde, dont la charge allélique ne baisse pas après 8 semaines de traitement par IFN seul (voir résultats de la publication associée à ce travail en annexe). Cette rémission moléculaire est associée à une diminution plus importante de la taille de la rate et à une absence de rechute des souris 9 semaines après arrêt du traitement alors que 70% des souris traitées par IFN seul rechutent, montrant bien une éradication de la maladie après traitement par cette combinaison. Ceci a été confirmé par une quasi disparition des cellules SLAM-positives sous la combinaison alors que cellules ci sont toujours bien présentes dans la condition IFN seule. Le mécanisme par lequel les progéniteurs et CSH murines sont éliminées par la combinaison est encore à être confirmé et il serait intéressant de voir si les SLAM correspondant à nos CSL humaines rentrent également en apoptose sous cette combinaison de traitement.

La spécificité du traitement IFN+As_2O_3 permet d'envisager une thérapie prometteuse pour les malades atteints d'un NMP *JAK2V617F*. Cependant, ces malades présentent souvent des mutations additionnelles associées dont on sait que la présence impacte négativement la réponse au traitement[268]. Les mutations additionnelles à *JAK2V617F* chez les malades étudiés ici sont connues

(détection par séquençage à haut débit sur un panel de 36 gènes les plus mutés dans les NMP). Il serait intéressant d'étudier la sensibilité clonogénique et en culture liquide de la combinaison en fonction des différentes classes de mutants. Il serait par exemple intéressant de voir si l'ajout d'Arsenic à l'IFN permet de resensibiliser les cellules présentant une mutation additionnelle dans *TET2* dont la présence confère une résistance à l'IFN seul. Il semble en effet que les mutations de l'épigénétique (TET2 mais également DNMT3A ou IDH1/2) entrainant une expansion du compartiment souche contrecarrent davantage le mécanisme d'exhaustion des cellules souches par l'IFN seul. L'Arsenic pourrait alors exercer une action toxique directe sur ces cellules souches leucémiques et restaurer une efficacité chez les doubles mutants *JAK2V617F/TET2*. D'autre part, il serait intéressant de comparer le profil de PML chez les doubles mutants vs *JAK2* seuls en l'absence de traitement et après traitement par IFN seul et sa combinaison à l'As_2O_3 afin de d'étudier un éventuel échappement à la sénescence.

D'autre part, il a été montré que des composants du PRC2 tel que *EZH2* jouent un rôle dans l'induction de sénescence. En effet il a été montré que durant l'induction de sénescence, l'expression d'*EZH2* est diminuée, inhibant ainsi la méthylation d'Histones (marques H3K27), ce qui aboutissait à la surexpression de p16 et favoriserait un SASP[323,410]. Ainsi chez les patients NMP présentant des mutations inactivatrices de *EZH2*, les cellules mutées *JAK2V617F/EZH2* pourraient être plus sensibles à la sénescence et donc au traitement par IFN+As_2O_3. Les voies de sénescence empruntées restent également à investiguer.

Enfin, les malades présentant des mutations inactivatrices de *TP53* sont assez fréquents. Il est dans ce cas intéressant d'étudier l'implication de p53 de notre processus de sénescence. Si p53 est activé dans les CN-PML et participe à l'activation de la voie finale impliquant p21, les malades porteurs de mutations de *TP53* pourraient répondre moins efficacement à cette thérapie. Au contraire si le mécanisme de sénescence n'implique p53 qu'en partie, cette thérapie pourrait bénéficier aux malades présentant ce profil moléculaire.

Ce travail dans les NMP *JAK2* mutés a permis de mettre en lumière le mécanisme d'action de l'IFN par induction d'une sénescence dépendante de PML et de proposer une combinaison améliorant grandement son efficacité dans les NMP *JAK2V617F*. La collaboration avec l'institut Gustave Roussy nous a permis de tester *in vitro* et *in vivo* la combinaison IFN+As_2O_3 et résultats très encourageants obtenus sur le plan de l'efficacité pré-clinique peut permettre d'introduire cette thérapie chez des malades réfractaires ou intolérants à l'IFN seul et ne présentant plus d'option thérapeutique. De plus, l'avantage que procure l'utilisation antérieure de cette combinaison dans d'autres maladies hématologiques et montrant sa bonne tolérance est un facteur favorable supplémentaire au développement d'un essai clinique chez ce type de malades.

ARTICLE N°1

Annals of Hematology (2019) 98:111–118
https://doi.org/10.1007/s00277-018-3499-y

ORIGINAL ARTICLE

Next-generation sequencing for JAK2 mutation testing: advantages and pitfalls

Nabih Maslah[1,2] · Emmanuelle Verger[1,2] · Marie-Helene Schlageter[1,2] · Jean-Michel Miclea[3] · Jean-Jacques Kiladjian[2,4,5] · Stephane Giraudier[1,2,5] · Christine Chomienne[1,2,5] · Bruno Cassinat[1,2]

Received: 17 September 2018 / Accepted: 17 September 2018 / Published online: 26 September 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract
The JAK2^{V617F} mutation is part of the major criteria for diagnosis of myeloproliferative neoplasms (MPN). Allele-specific quantitative PCR (qPCR) is the most prevalent method used in laboratories but with the advent of next-generation sequencing (NGS) techniques, we felt necessary to evaluate this approach for *JAK2* mutations testing. Among DNA samples from 427 patients analyzed by qPCR and NGS, we found an excellent concordance between both methods when allelic burden was superior to 2% (the detection limit of our NGS assay). Only one sample among 298 was found negative by NGS while allelic burden by qPCR was 3%. Because NGS detection limit is higher, sensitivity was lower as exemplified by 21 samples found negative whereas qPCR measured allelic burdens between 0.1 and 1%. Importantly, quantitative data of samples found positive by both techniques were highly correlated ($R^2 = 0.9477$). We also evaluated 40 samples tested for *JAK2* exon 12 mutations by HRM. The concordance with NGS was of 100%. Using NGS, the full coding region of *JAK2* was analyzed leading to identification of several variants outside of exon 12 and 14 which were previously described or not. Interestingly, we found one somatic mutation (c.1034A>T p.H345L) which induced constitutive activation of the JAK/STAT pathway leading to an increased proliferation of BaF/3 cells with low-dose EPO. This study showed that NGS is a robust method highly correlated to qPCR, although less sensitive, but providing the opportunity to identify other JAK2 variants with potential impact on disease initiation or evolution.

Keywords JAK2 · Next-generation sequencing · Mutation · Diagnosis · Myeloproliferative neoplasm

Introduction

The classical myeloproliferative neoplasms (MPNs), also called BCR-ABL negative MPNs, are characterized by excessive production of terminally differentiated and functional blood cells. MPNs have been subdivided into three entities: polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). The diagnosis of MPNs has changed dramatically with the discovery of a somatic point mutation in the *JAK2* gene (c.1849G>T or JAK2^{V617F}) [1]. One major criterion for the diagnosis of MPNs is the detection of this mutation [2] which can be found at the heterozygous state or present on both *JAK2* alleles due to mitotic recombination [3, 4]. Variation of mutant allele burden thus reflects both the size of the myeloproliferative clone and the homozygous or heterozygous status of clonal cells. It has been shown that JAK2^{V617F} allele burdens (%JAK2VF) are higher in PV than in ET [5, 6]. In addition, a high %JAK2VF has been associated with increased risk of thrombotic events in ET, increased risk of cardiovascular events, larger spleen and greater treatment requirement in PV, higher leukocytosis, and risk of acute transformation in PMF [7–9]. Although these findings have not been confirmed in every study [10] and no requirements are indicated in the WHO recommendations, such association between %JAK2VF and disease evolution argues for the need to precisely assess the %JAK2VF. Furthermore, quantitative follow-up of JAK2^{V617F} allelic burden is informative for minimal residual disease evaluation after

✉ Bruno Cassinat
bruno.cassinat@aphp.fr

1 APHP, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Hopital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France

2 INSERM, UMRS_1131, Institut Universitaire d'Hématologie, Hopital Saint-Louis, Université Paris-Diderot, Paris, France

3 Service d'Oncologie et d'Hematologie, Hopital Louis Pasteur, Chartres, France

4 APHP, Centre d'Investigations Cliniques, Hopital Saint-Louis, Paris, France

5 Universite Paris Diderot, Paris, France

allogeneic bone marrow transplantation [11] but also in patients undergoing interferon alpha [12–14] or JAK2 inhibitor therapies [15]. Several methods have been developed throughout time to quantify the %JAK2VF in peripheral blood leukocytes, most of them based on real-time allele-specific PCR have been compared in a joint European collaborative study [16].

Several other mutations in the *JAK2* gene have been described throughout time. First, somatic activating mutations in the exon 12 of the *JAK2* gene were recurrently described in $JAK2^{V617F}$-negative PV patients [17, 18]. Then, several germline or somatic *JAK2* variants were described and some of them shown to confer cytokine independency to hematopoietic cells [19–24]. It is thus considered that such variants could at least participate to leukemogenesis in MPN patients, although animal models are lacking in most cases. In the recent studies, these *JAK2* variants were identified using next-generation sequencing (NGS) techniques which allow an easy sequencing of the whole coding regions of this gene. These techniques are more and more accessible to many laboratories and are seen as potentially replacing the real-time PCR methods.

In this context, we aimed at comparing the allele-specific $JAK2^{V617F}$ quantitative PCR technique routinely used in our laboratory to the NGS method we recently introduced for the molecular screening of MPNs patients. We further scrutinized the non-exon 12 or 14 *JAK2* variants identified using NGS method and modeled one non-described somatic variant.

Materials and methods

Samples

From January 2013 to September 2017, NGS was performed in our laboratory at Saint-Louis Hospital on 473 consecutive DNA samples extracted from peripheral blood of patients known or suspected to develop MPN. The same DNA samples were also tested in our laboratory for the quantification of the $JAK2^{V617F}$ mutation.

$JAK2^{V617F}$ and other *JAK2* variants

The $JAK2^{V617F}$ mutation was quantified using a quantitative real-time allele-specific PCR (qPCR) method (Ipsogen JAK2 MutaQuant kit, Qiagen, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Detection limit of this assay is set at 0.1%. An NGS panel was developed in our laboratory using the TruSeq Custom Amplicon method (TSCA; Illumina, San Diego, CA, USA). Specific oligo probes were designed for 27 genes among which the full coding regions of the *JAK2* gene were comprised. Total blood DNA was quantified using a Qubit instrument and 250 ng were used as input for amplicon-based library preparation according to manufacturer's instructions. Libraries were loaded on a MiSeq instrument (Illumina) at 10pM and run using a MiSeq Reagent kit v2 (500 cycles) (Illumina). Obtained sequences were aligned to the reference genome (GRCh37/hg19) and variants were called and annotated using a pipeline developed by Sophia Genetics (Sophia Genetics, Switzerland). Variants were retained according to the following criteria: exonic non-synonymous variants; minimum coverage of 500×; minimum variant allele frequency (VAF) of 2%; removal of known polymorphisms (SNPs) presenting a frequency > 0.01% (1000 genome, ExAC).

Site-directed mutagenesis

Both p.H345L and p.V617F JAK2 mutations were individually introduced into the TMJ-JAK2-GFP WT (kindly provided by Chloé James) plasmid using QuikChange® II site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). The following oligonucleotides serving as templates for the synthesis of the mutant plasmids were synthesized by Eurogentec. The reaction sample was prepared by mixing 5 μL of 10× reaction buffer, 20 ng of plasmid, 125 ng of each oligonucleotide (c.1034C>T 8F: GCCGAGTTGTAACTATCCTTAAGCAA GATGGTAAAAATC, 8R: GATTTTTACCATCTTGCTTA AGGATAGTTACAACTCGG) and (c.1849G>T 14F: AGCATTTGGTTTTAAATTATGGAGTATGTTTCTGTGGA GACGAGA; 14R: TCTCGTCTCCACAGAAACATACTCCA TAATTTAAAACCAAATGCT), 1.5 μL of Quicksolution reagent, 1 mL of QuickChange Lightning Enzyme and H2O for a reaction volume of 50 μL.

Strand synthesis was carried out according to a protocol of amplification recommended by the manufacturer, with a final extension of the strand of 7 min. Enzymatic digestion of the non-mutated strand was performed by adding 2 μL of Dpn-I enzyme (Agilent) to the reaction medium and incubating for 5 min at 37 °C. Plasmids were transformed into XL-10 Gold Ultracompetent (Agilent) cells.

In each case, the presence of the mutation was verified by Sanger sequencing using the following primers. For the c.1034C>T p.H345L mutant: forward primer, 5′-GGAA ACTCTGCAGTCTGCCT-3′, and reverse primer: 5′-GGGC CATGACAGTTGCTTTG-3′. For the c.1849G>T p.V617F mutant, forward primer, 5′-TCTTTCTTTGAAGCAGCAAG TATG-3′ and reverse primer: 5′-TGGCCCATGCCAAC TGTTTA-3′.

Cell lines and culture

The BaF/3 cell line overexpressing the human erythropoietin receptor (BaF/3 R-EPO) was grown at 37 °C in RPMI (Gibco), 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin, 1% Glutamax, and EPO (1 IU/mL) under 5% CO_2. Cells were transfected using the Amaxa instrument (Lonza). Briefly, 2×10^6 cells were placed in the presence of a mixture consisting of 2 μg of TMJ-JAK2-GFP of each type described

above and Amaxa Cell Line Nucleofactor Kit V solution (Lonza). After the electroporation was performed, cells were cultured without antibiotic for 24 h and the transfection rate was assessed at 24 h by measuring GFP-positive cells by FACS analysis (FACS Canto II, Becton Dickinson).

Cell sorting

At 24-h post-transfection GFP-positive cells (MFI > 10^4) were sorted (FACSAria II, Becton Dickinson) into wells containing RPMI (Gibco), 10% FBS, 1% Penicillin-Streptomycin (Gibco), 1% Glutamax (Gibco), and EPO (1 IU/mL). One week after sorting, the percentage of GFP-positive cells was verified to be > 99% by FACS analysis (FACSCanto II, Becton Dickinson).

Proliferation assay

Each of the BaF/3 clones overexpressing one of the JAK2 variants (WT, p.V617F, and p.H345L) was cultured at 2 × 10^5/mL in triplicate. Cell proliferation was assessed by daily counting from day 1 to day 4 using trypan blue staining in a TC20 automatic counter (Biorad).

Results

Detection and quantification of the JAK2^{V617F} mutation in MPNs samples using qPCR or NGS

We analyzed the data obtained from 473 samples evaluated by NGS and qPCR, corresponding to 427 patients suspected to develop MPN. The cohort consisted of 215 men and 212 women (sex ratio = 1.01), mean age was 51 years (ranging from 15 to 89 years). The majority of samples (N = 185, 44%) were from primary or secondary myelofibrosis patients while PV and ET patients accounted for 26% (N = 112) and 25% (N = 108) respectively. MPN/MDS represented 4.5% of the cohort, and 2 patients tested for recurrent thrombosis were found JAK2^{V617F} positive at low level (VAF: 0.5%). In 46 patients, 2 different samples were evaluated to follow disease evolution.

We compared the accuracy of both methods in terms of JAK2^{V617F} detection and quantification. A positive result was found by the two techniques in 276 samples (Table 1), in which the comparison of quantitative results showed a positive correlation (R^2 = 0.9477, slope = 0.9911, Fig. 1), with a Lin concordance coefficient estimated at 0.975 which confirms an excellent concordance between the two techniques [25].

Discordant results were found in 25 samples: 22 of them were found negative by NGS whereas the mutation was detected at low level by qPCR. Indeed, 21 samples were found below the %JAK2VF threshold of 2% that we established for NGS detection. Only 1 sample was really discordant among the 22, as it was assigned with a 3% allele burden by qPCR. We did not identify any explanation for this discrepancy and concluded to false negativity with NGS in this sample. On the contrary, 3 samples were found positive by NGS but negative by qPCR (Table 1). In one of these discrepant cases, the JAK2^{V617F} mutation resulted from a genetic alteration different from the usual one. Instead of the classical c.1849G>T substitution, NGS analysis identified two substitutions targeting nucleotides 1848 and 1849 (c.1848_1849delTGinsCT). Although the resulting amino acid change was identical (p.V617F), the DNA sequence was different. The second discrepant case harbored both the classical c.1849G>T (p.V617F) mutation together with a substitution located 11 nucleotides away (c.1860C>A) targeting codon 620 (p.D620E). Such mutant has already been described [26]. Finally, we also identified by NGS a double mutant in the third sample. In addition to the classical JAK2^{V617F} mutation, the

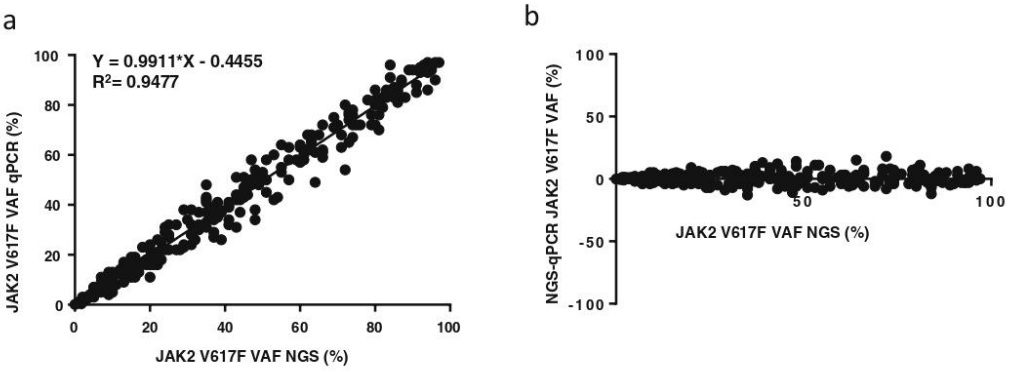


Fig. 1 Comparison of qPCR and NGS techniques for the detection and quantification of the JAK2^{V617F} mutation. **a** Correlation curve showing variant allelic fraction (VAF) found in qPCR (Mutaquant, Ipsogen), and in NGS (TSCA, Illumina) in 276 MPN samples found positive for JAK2^{V617F} mutation in both techniques. **b** Difference of VAFs between NGS and qPCR for the 276 samples

Table 1 Results of $JAK2^{V617F}$ mutation detection in 473 samples using qPCR and NGS

	Negative NGS	Positive NGS	Total
Positive qPCR	22	276	298
Negative qPCR	172	3	175
Total	194	279	473

c.1843G>T (p.V615L) was present. This association of p.V615L with p.V617F has already been reported [27]. All these mutations were confirmed by Sanger sequencing. Although the $JAK2^{V617F}$ mutation was present in these three samples, the presence of additional nucleotide changes probably interfered with the mutation-specific primer annealing, explaining false negativity by qPCR [26, 28].

Interestingly, we also had the opportunity to compare the results for mutations located in the exon 12 of the *JAK2* gene. Among 40 samples analyzed with HRM (high-resolution melting curve analysis) and NGS techniques, the correlation was excellent since the 4 HRM-positive samples were correctly detected using NGS technique, without false-positive result (Table 2).

NGS allows detection of other rare JAK2 variants in MPNs

Compared to allele-specific PCR or HRM, the NGS approach allows covering much larger genomic regions, making easy to sequence the full coding regions of the *JAK2* gene. The analysis of the 473 samples identified both already known and previously undescribed variants (Table 3). In total, 28 different variants were present in 52 distinct patients among the cohort of 427 patients (12%). These variants were concomitantly present with the $JAK2^{V617F}$ mutation in 24 patients (45%) or with CALR mutants in 8 patients (16%) but never with an MPL mutant. Several variants were previously described as germline mutations (Table 3). Among these, c.2538G>C (p.E846D) and c.3323A>G (p.N1108S) were identified in two and four patients respectively while the c.3188G>A (p.R1063H) was found with a high frequency in our cohort (18 patients, 4%), significantly higher than the minor allelic fraction described in dbSNP (0.4%). Three variants identified in few patients in this study are referenced as rare single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genomic databases such as dbSNP (c.98A>C, p.K33T; c.380G>A, p.G127D or c.731A>G, p.K244R). For two variants of unknown significance (c.415G>A, p.G139S or c.448A>C, p.M150L), the VAFs were close to 50% and thus compatible with SNPs. However, we identified four variants present with VAFs below 30%, thus suggesting a somatic acquisition (c.2251G>C, p.D751H VAF 9%; c.841G>A, p.G281S VAF 21%; c.1034A>T p.H345L VAF 29%; c.2449_2451delACA, p.T817del VAF 5%).

Table 2 Results of JAK2 exon 12 mutation detection in 40 samples using HRM and NGS

	Negative NGS	Positive NGS	Total
Positive HRM	0	4	4
Negative HRM	41	0	41
Total	41	4	45

The JAK2 p.H345L variant detected in NGS is associated with cytokine hypersensitivity

Among the variants of unknown significance identified in this study, we were particularly interested in the p.H345L mutant because several mutants have been described in close vicinity at codons 317 (p.Y317H) and 340 (p.R340Q) [24]. The mutation was identified in a 65-year-old man diagnosed with PMF. This patient also presented with a type 1 *CALR* mutation (VAF 41%) and an *IDH1* mutation (c.395G>A, p.R132H VAF 30%). We first excluded a potential germline origin of the mutation by studying DNA extracted from patient's nails, in which only the wild-type sequence of *JAK2* was detectable. To evaluate the functional consequences of this mutant, BaF/3 cells expressing the EPO receptor were transfected with plasmids containing the *JAK2* wild-type ($JAK2^{WT}$), $JAK2^{V617F}$, or $JAK2^{H345L}$ genes. At low concentration of EPO, the cells expressing $JAK2^{H345L}$ grew significantly better compared to $JAK2^{WT}$ cells (Fig. 2a) demonstrating that the presence of the p.H345L mutation conferred cytokine hypersensitivity to the BaF/3 cells. The dose-response curve at increasing EPO concentrations showed a maximal proliferation rate achieved at doses 5 to 10 times lower in BaF/3 cells expressing $JAK2^{H345L}$ compared to $JAK2^{WT}$ cells, approaching results of $JAK2^{V617F}$ expressing cells (Fig. 2b). As a confirmation, we found that the JAK2/STAT5 pathway was over-activated by $JAK2^{H345L}$. Indeed, STAT5 was constitutively phosphorylated in $JAK2^{H345L}$ BaF/3 cells in the absence of EPO. Furthermore, significantly higher levels of phospho-STAT5 were observed after EPO stimulation (Fig. 2c, d). In conclusion, these elements strongly suggest that JAK2 p.H345L is a gain-of-function mutant which induces a stronger stimulation of the JAK2/STAT5 pathway resulting in a proliferation advantage compared to the JAK2 WT cells.

Discussion

Identification of the $JAK2^{V617F}$ mutation using allele-specific qPCR techniques has been a gold standard for the diagnosis and monitoring of patients for about 10 years because of its high sensitivity and its accuracy for quantifying allelic burden in patients [16]. Confirming previous studies [29, 30], we

Table 3 Other JAK2 variants found by NGS in a cohort of 427 MPN patients

JAK2 variant	Protein	Germline/ somatic	MAF	Reference	Number of patients
c.98A>C	p.K33T	NA	NA	rs538474116	1
c.380G>A	p.G127D	Germline	0.20%	rs56118985	1
c.415G>A	p.G139S	NA	NA	NA	1
c.448A>C	p.M150L	NA	NA	NA	1
c.731A>G	p.K244R	Germline	0.20%	rs62637625	2
c.841G>A	p.G281S	NA	NA	NA	1
c.901G>A	p.G301R	NA	NA	NA	1
c.1009A>C	p.N337D	NA	0.20%	rs149683525	1
c.1019G>A	p.R340Q	Somatic	0.003%	COSM88204	2
c.1034A>T	p.H345	NA	NA	NA	1
c.1075T>A	p.L359I	NA	NA	NA	1
c.1711G>A	p.G571S	Somatic	0.01%	COSM29107	2
c.1718T>C	p.L573P	NA	NA	NA	1
c.1805G>C	p.S602T	NA	NA	NA	1
c.1843G>T	p.V615L	NA	NA	Lippert 2014	1
c.1848_1849delTGinsCT	p.V617F	NA	NA	NA	1
c.1860C>A	p.D620E	NA	NA	Grünebach 2006	1
c.2008A>G	p.I670V	NA	0.003%	rs771779649	1
c.2251G>C	p.D751H	NA	NA	NA	1
c.2438A>G	p.Y813C	NA	NA	NA	2
c.2449_2451delACA	p.T817del	NA	NA	NA	1
c.2538G>C	p.E846D	Germline	0.05%	rs150221602	2
c.2696T>C	p.I899T	NA	0.01%	rs200282557	1
c.2767C>T	p.R923C	NA	0.003%	COSM4384408	1
c.3152T>C	p.I1051T	NA	0.01%	rs375671491	1
c.3163A>G	p.K1055E	NA	0.002%	rs774539976	1
c.3188G>A	p.R1063H	Germline	0.40%	rs41316003	18
c.3323A>G	p.N1108S	Germline	0.20%	COSM33708	4

NA not available

show here that this mutation can be accurately detected by a NGS approach. By comparing results obtained using NGS and qPCR on a large cohort of 427 patients, we found an excellent correlation of quantitative data. The main limitation of NGS in our hands was sensitivity. Indeed, with a higher threshold of detection compared to qPCR, several samples with low allelic burdens were found negative. It appeared that qPCR is better suited to the evaluation of minimal residual disease under treatment or after allogeneic bone marrow transplantation [11]. However, using highly sensitive approaches, NGS proved to be able to detect $JAK2^{V617F}$ at low levels [29].

Since the discovery of the $JAK2^{V617F}$ mutation in 2005 [1] and the JAK2 exon 12 mutations in 2007 [17], several other mutants have been reported in MPNs. These mutations can affect the FERM domain or the kinase domain, can be found isolated or associated with driver mutations in *JAK2* or *CALR*, and may be germline or somatically acquired [19, 20, 22, 26, 31–33]. Mutants altering the kinase domain are usually associated with thrombocytosis or polycythemia [21, 24]. Some of the alternative mutations were functionally characterized showing in some cases a moderate to high gain of function as determined by the ability of cell lines to grow in the presence of low EPO concentrations and by activation of the JAK/STAT pathway. Among the mutants, we have identified in our cohort, the p.R1063H and the p.E846D germline mutants have been shown to weakly induce JAK/STAT signaling when tested separately [23]. However, when both mutants were co-expressed in the same cells, they cooperated to induce a stronger activation [23]. Although animal models are lacking, these results suggest that these germline mutants may cooperate together and probably with $JAK2^{V617F}$ as well, and may participate to the disease initiation or evolution. Interestingly, in our cohort, the p.R1063H was present in 4% of patients (in 39% of cases associated with $JAK2^{V617F}$ and in 17% with a *CALR* mutant). It would thus be interesting to evaluate

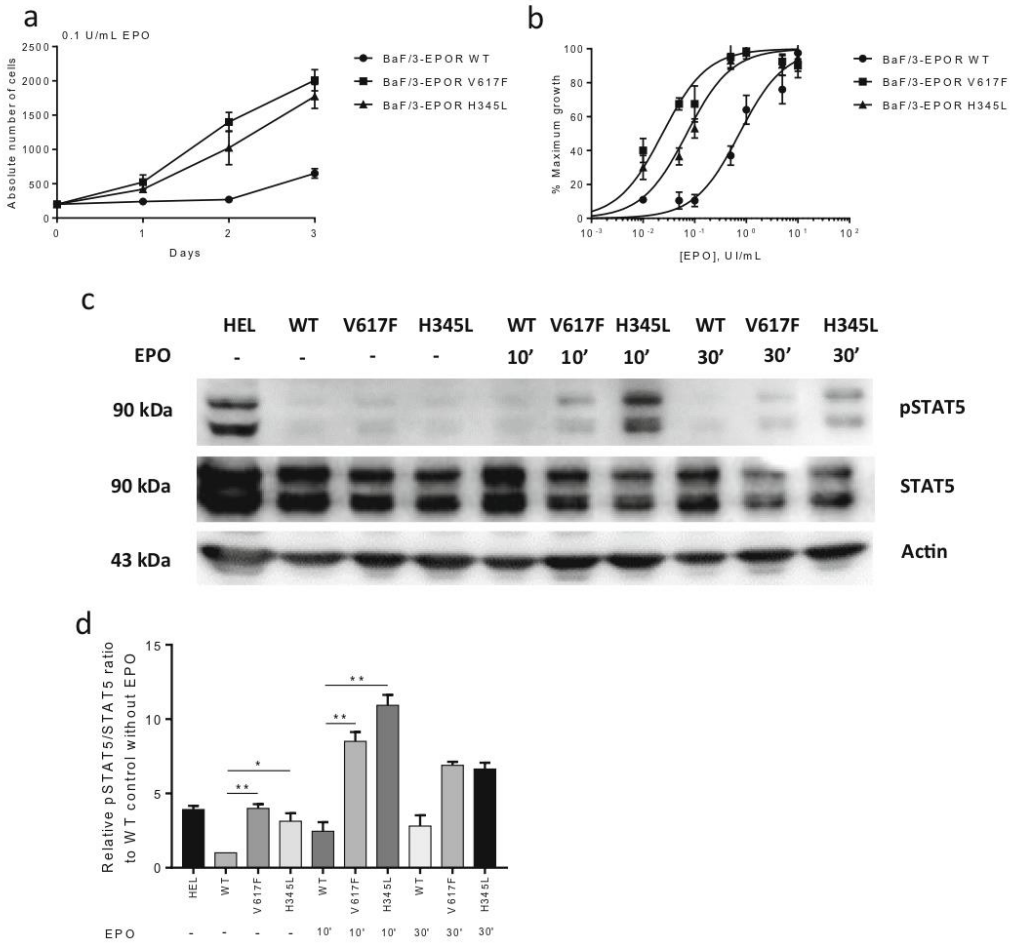


Fig. 2 The JAK2^{H345L} variant is associated with cytokine hypersensitivity. **a** Absolute numbers of cells at low dose of EPO (0.1 IU/mL) in BaF/3 cells stably expressing JAK2 wild-type (WT), JAK2^{V617F}, or JAK2^{H345L}. **b** Dose response to increasing doses of EPO curve BaF/3 cells stably expressing the different forms of JAK2. **c**, **d** Western blot of phopho-STAT5, total STAT5, and actin expression before and after treatment with EPO of BaF/3 cells stably expressing the different forms of JAK2. The JAK2^{V617F}-positive HEL cell line is used as control

whether such patients evolve differently than patients with JAK2^{V617F} alone.

We identified one novel somatic variant exhibiting an obvious gain of function. This p.H345L mutant affects the FERM domain of the JAK2 protein, responsible for the interaction with cytokine receptors. This could explain its impact on kinase activity and cell growth. Several mutants have been reported in this region, in positions 293, 317, 337, and 340 respectively and we identified in the present study another mutant in position 301 (p.G301R, VAF 8%). Although p.R340Q did not appear to modify cell proliferation or JAK/STAT signaling, p.Y317H was shown to be a gain-of-function mutant giving a proliferative advantage to mutated cells [24]. Together with our results on the p.H345L, this suggests that acquired mutations in the FERM domain of JAK2 could be a novel region of interest for MPN pathogenesis. The clinical outcome of patients with such mutations should be scrutinized in future studies.

The p.H345L mutant we identified was present in a patient with a *CALR* mutation. According to the VAFs of each

mutation (37% for CALR and 29% for JAK2^{H345L}), it is highly likely that both mutations were present in the same clone. Although the coexistence of both JAK2^{V617F} and *CALR* mutations in the same patients have already been described [34], the functional impact due to the potential cooperation between these mutants has not been tested yet. These results together with our observation deserve further studies to characterize the consequences of the co-occurrence of these mutations in the same cells, which could lead to the activation of the MPL-dependent signaling by two different routes.

In conclusion, we show that NGS allows the detection of the JAK2^{V617F} mutation with comparable performances, but weaker sensitivity, to qPCR as well as the detection of new potentially pathogenic *JAK2* variants in MPN patients.

Acknowledgments We are grateful to the Cell Biology department team in Saint-Louis hospital for technical help and to Dr. Chloe James (Bordeaux) for providing the TMJ-JAK2-GFP plasmid.

Funding information NM was paid by a grant from Inserm (Poste d'accueil Inserm).

Compliance with ethical standards

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

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

1. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W (2005) A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature 434:1144–1148
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW (2016) The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood 127:2391–2405
3. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT (2002) Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. Exp Hematol 30:229–236
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC (2005) A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med 352:1779–1790
5. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 108:1865–1867
6. Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Della Porta MG, Boveri E, Pascutto C, Vanelli L, Arcaini L, Burcheri S, Malcovati L, Lazzarino M Cazzola M (2006) Relation between JAK2 (V617F) mutation status, granulocyte activation, and constitutive mobilization of CD34+ cells into peripheral blood in myeloproliferative disorders. Blood 107:3676–3682
7. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Longo G, Pancrazzi A, Ponziani V, Bogani C, Ferrini PR, Rambaldi A, Guerini V, Bosi A, Barbui T, MPD Research Consortium (2007) Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. Leukemia 21:1952–1959
8. Vannucchi AM, Antonioli E, Guglielmelli P, Rambaldi A, Barosi G, Marchioli R, Marfisi RM, Finazzi G, Guerini V, Fabris F, Randi ML, De Stefano V, Caberlon S, Tafuri A, Ruggeri M, Specchia G, Liso V, Rossi E, Pogliani E, Gugliotta L, Bosi A, Barbui T (2007) Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. Blood 110:840–846
9. Barosi G, Bergamaschi G, Marchetti M, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, Massa M, Rosti V, Campanelli R, Villani L, Viarengo G, Gattoni E, Gerli G, Specchia G, Tinelli C, Rambaldi A, Barbui T, Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Italian Registry of Myelofibrosis (2007) JAK2 V617F mutational status predicts progression to large splenomegaly and leukemic transformation in primary myelofibrosis. Blood 110:4030–4036
10. Pemmaraju N, Molitemo AR, Williams DM, Rogers O, Spivak JL (2007) The quantitative JAK2 V617F neutrophil allele burden does not correlate with thrombotic risk in essential thrombocytosis. Leukemia 21:2210–2212
11. Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhäuser M, Reiter A, Zabelina T, Zander AR, Fehse B (2007) Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. Blood 109:1316–1321
12. Kiladjian JJ, Cassinat B, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, Menot ML, Massonnet G, Dutel JL, Ghomari K, Rousselot P, Grange MJ, Chait Y, Vainchenker W, Parquet N, Abdelkader-Aljassem L, Bernard JF, Rain JD, Chevret S, Chomienne C, Fenaux P (2006) High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. Blood 108:2037–2040
13. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, Bellucci S, Grandchamp B, Chomienne C, Fenaux P (2008) Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. Blood 112:3065–3072
14. Quintás-Cardama A, Abdel-Wahab O, Manshouri T, Kilpivaara O, Cortes J, Roupie AL, Zhang SJ, Harris D, Estrov Z, Kantarjian H, Levine RL, Verstovsek S (2013) Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α-2a. Blood 122:893–901
15. Vannucchi AM, Verstovsek S, Guglielmelli P, Griesshammer M, Burn TC, Naim A, Paranagama D, Marker M, Gadbaw B, Kiladjian JJ (2017) Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study. Ann Hematol 96:1113–1120
16. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, Lippert E, Oppliger Leibundgut E, Cassinat B, Pallisgaard N, Maroc N, Hermouet S, Nickless G, Guglielmelli P, van der Reijden BA, Jansen JH, Alpermann T, Schnittger S, Bench A, Tobal K, Wilkins B, Cuthill K, McLornan D, Yeoman K, Akiki S, Bryon J, Jeffries S, Jones A, Percy MJ, Schwemmers S, Gruender A, Kelley TW, Reading S, Pancrazzi A, McMullin M, Pahl HL, Cross NC, Harrison CN, Prchal JT, Chomienne C, Kiladjian JJ, Barbui T, Grimwade D (2013) Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction

assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. Leukemia 27:2032–2039
17. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, Futreal PA, Erber WN, McMullin MF, Harrison CN, Warren AJ, Gilliland DG, Lodish HF, Green AR (2007) JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. New Engl J Med 356:459–468
18. Kouroupi E, Zoi K, Parquet N, Zoi C, Kiladjian JJ, Grigoraki V, Vainchenker W, Lellouche F, Marzac C, Schlageter MH, Dosquet C, Scott LM, Fenaux P, Loukopoulos D, Chomienne C, Cassinat B (2008) Mutations in exon 12 of JAK2 are mainly found in JAK2 V617F-negative polycythaemia vera patients. Br J Haematol 142: 676–679
19. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005) Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell 7:387–397
20. Etheridge SL, Cosgrove ME, Sangkhae V, Corbo LM, Roh ME, Seeliger MA, Chan EL, Hitchcock IS (2014) A novel activating, germline JAK2 mutation, JAK2R564Q, causes familial essential thrombocytosis. Blood 123:1059–1068
21. Marty C, Saint-Martin C, Pecquet C, Grosjean S, Saliba J, Mouton C, Leroy E, Harutyunyan AS, Abgrall JF, Favier R, Toussaint A, Solary E, Kralovics R, Constantinescu SN, Najman A, Vainchenker W, Plo I, Bellanné-Chantelot C (2014) Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. Blood 123:1372–1383
22. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, Bagienski K, Kubesova B, Pietra D, Gisslinger B, Milanesi C, Jäger R, Chen D, Berg T, Schalling M, Schuster M, Bock C, Constantinescu SN, Cazzola M, Kralovics R (2016) Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood 127:325–332
23. Kapralova K, Horvathova M, Pecquet C, Fialova Kucerova J, Pospisilova D, Leroy E, Kralova B, Milosevic Feenstra JD, Schischlik F, Kralovics R, Constantinescu SN, Divoky V (2016) Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. Blood 128: 1418–1423
24. Eder-Azanza L, Hurtado C, Navarro-Herrera D, Aranaz P, Novo FJ, Vizmanos JL (2017) p.Y317H is a newJAK2gain-of-function mutation affecting the FERM domain in a myelofibrosis patient with CALR mutation. Haematologica 102:e328–e331
25. Barnhart HX, Haber M, Song J (2002) Overall concordance correlation coefficient for evaluating agreement among multiple observers. Biometrics 58:1020–1027
26. Schnittger S, Bacher U, Kern W, Schröder M, Haferlach T, Schoch C (2006) Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. Leukemia 20:2195–2197
27. Lippert E, Mansier O, Migeon M, Denys B, Nilsson A, Rosmond C, Lodé L, Ugo V, Lascaux A, Bellosillo B, Martinez-Lopez J, Naguib D, Gachard N, Maroc N, Hermouet S (2014) Clinical and biological characterization of patients with low (0.1-2%) JAK2V617F allele burden at diagnosis. Haematologica 99:e98–e101
28. Warshawsky I, Mularo F, Hren C, Jakubowski M (2010) Failure of the Ipsogen MutaScreen kit to detect the JAK2 617V>F mutation in samples with additional rare exon 14 mutations: implications for clinical testing and report of a novel 618C>F mutation in addition to 617V>F. Blood 115:3175–3176
29. Abdelhamid E, Figeac M, Renneville A, Quief S, Villenet C, Boyer T, Nibourel O, Coiteux V, Cassinat B, Lippert E, Helevaut N, Soua Z, Preudhomme C (2013) Quantification of JAK2V617F mutation by next-generation sequencing technology. Am J Hematol 88:536–537
30. Kirschner MM, Schemionek M, Schubert C, Chatain N, Sontag S, Isfort S, Ortiz-Brüchle N, Schmitt K, Krüger L, Zerres K, Zenke M, Brümmendorf TH, Koschmieder S (2015) Dissecting genomic aberrations in myeloproliferative neoplasms by multiplex-PCR and next generation sequencing. PLoS One 10:e0123476
31. Siemiatkowska A, Bieniaszewska M, Hellmann A, Limon J (2010) JAK2 and MPL gene mutations in V617F-negative myeloproliferative neoplasms. Leukemia Res 34:387–389
32. Aranaz P, Ormazábal C, Hurtado C, Erquiaga I, Calasanz MJ, García-Delgado M, Novo FJ, Vizmanos JL (2010) A new potential oncogenic mutation in the FERM domain of JAK2 in BCR/ABL1-negative and V617F-negative chronic myeloproliferative neoplasms revealed by a comprehensive screening of 17 tyrosine kinase coding genes. Cancer Genet Cytogenet 199:1–8
33. Rumi E, Harutyunyan AS, Casetti I, Pietra D, Nivarthi H, Moriggl R, Cleary C, Bagienski K, Astori C, Bellini M, Berg T, Passamonti F, Kralovics R, Cazzola M (2014) A novel germline JAK2 mutation in familial myeloproliferative neoplasms. Am J Hematol 89:117–118
34. Mansier O, Luque Paz D, Ianotto JC, Le Bris Y, Chauveau A, Boyer F, Conejero C, Fitoussi O, Riou J, Adiko D, Touati M, Chauzeix J, Viallard JF, Béné MC, Giraudier S, Ugo V, Lippert E (2018) Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. Am J Hematol 93:E84–E86

ARTICLE N°2

Received: 13 February 2020 | Revised: 2 June 2020 | Accepted: 10 June 2020

DOI: 10.1111/ijlh.13282



ORIGINAL ARTICLE

ISLH International Journal of Laboratory Hematology WILEY

Pitfalls in CALR exon 9 mutation detection: A single-center experience in 571 positive patients

Emmanuelle Verger[1,2] | Nabih Maslah[1,2] | Marie-Helene Schlageter[1,2] | Christine Chomienne[1,2] | Jean-Jacques Kiladjian[2,3,4] | Stephane Giraudier[1,2,3] | Bruno Cassinat[1,2,3]

[1]Laboratoire de Biologie Cellulaire, AP-HP, Hopital Saint-Louis, Paris, France

[2]Université de Paris, U1131 INSERM, IRSL, Paris, France

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

[4]Centre d'Investigations Cliniques, Hopital Saint-Louis, Paris, France

Correspondence
Bruno Cassinat, Laboratoire de Biologie Cellulaire, Hopital Saint-Louis, 1 avenue Claude Vellefaux, Paris 75010, France.
Email: bruno.cassinat@aphp.fr

Abstract

Introduction: The pathogenesis of myeloproliferative neoplasms (MPNs) is closely related to the acquisition of specific molecular alterations in *JAK2*, *MPL*, or *CALR* genes, the presence of which represent major diagnostic criteria in the WHO classification. The *CALR* exon 9 insertions and deletions are very heterogeneous, and their detection mainly relies on polymerase chain reaction (PCR) fragment length analysis.

Methods: We report on the rare nonclassical profiles that we observed among the 1382 patients analyzed by PCR fragment length analysis. In difficult cases, we tested germline DNA and performed NGS analysis.

Results: We faced some troubling results because of the presence of several unexpected peaks. Our investigations showed that they resulted from a mix of isolated or double somatic mutations combined with germline alterations which could be misleading for a correct diagnosis. The precise interpretation of such difficult cases is mandatory as a misinterpretation could lead to the prescription of cytoreductive drugs to nondiseased persons or to an absence of treatment in true MPN patients.

Conclusion: Our observations showed that every mutation should be verified by direct Sanger sequencing, and we show that sometimes it may be necessary to study germline DNA and to complement with NGS analysis to precisely interpret the molecular alterations.

KEYWORDS

CALR, calreticulin, diagnosis, myeloproliferative neoplasms

1 | INTRODUCTION

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal hematological malignancies represented by polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). The pathogenesis of MPNs is closely linked to the acquisition at the stem cell level of specific molecular alterations. Mutations in the *JAK2* gene are present in mostly all PV patients and around 60% of ET or PMF patients.[1] Besides of *JAK2* mutations, the presence of *CALR* exon 9 mutations has been identified in ET or PMF patients only, with a frequency approaching 30%, while *MPL* mutations are present in 5 to 10% of these patients.[2,3] The *CALR* exon 9 mutations are highly heterogeneous at the nucleotide level with insertions or deletions from 1 to over 50 nucleotides. However, all these mutations result in a + 1 bp frameshift very similar mutant proteins with a novel C-terminal sequence harboring common characteristics. Among these, the most important characteristics are the acquisition of a positively charged amino acid sequence (the wild-type region is negatively charged) and the loss of the KDEL terminal sequence which is necessary for the retention into the endoplasmic reticulum. Several recent studies

 © 2020 John Wiley & Sons Ltd

have participated to elucidate how this novel protein sequence is responsible for MPN pathogenesis by inducing an abnormal interaction between mutant CALR and the MPL protein (which is the thrombopoietin receptor) leading to a deregulated activation of the JAK/STAT pathway and hence a MPN phenotype.[4-13]

Detection of *CALR* mutations is now considered an essential tool for diagnosing MPN as the presence of a molecular driver is part of the major criteria of the World Health Organization (WHO) classification.[14] Since the discovery of *CALR* mutations in 2013, several reports have been published about laboratory methods dedicated at their identification. However, due to the heterogeneity of nucleotide sequences observed in patients the most frequently used method is still the fragment analysis while allele-specific methods are restricted to the detection of type 1 and type 2 mutations only.[15] More recently, inframe deletions have been reported that likely represent rare polymorphisms with no impact on protein function.[16-18] In this study, we report on 1382 patients suspected of MPN referred to our laboratory for the detection of *CALR* exon 9 mutations. We identified complex molecular profiles due to coexisting polymorphic inframe and somatic frameshift alterations, which may be misleading for a correct diagnosis of MPN.

2 | METHODS

Whole blood DNA was extracted using the DNA blood mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instruction. As previously described,[19] *CALR* Exon 9 mutations were detected using fluorescent dye-labeled polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by fragment length analysis on a 3500 × L DX Genetic Analyzer (Life Technologies). The precise nucleotide sequence of the variants detected was confirmed using Sanger sequencing or a capture-based next generation sequencing (NGS) targeted gene panel (Sophia Genetics) including the *CALR* exon 9 gene region, the variant calling, and all the bio-informatics being performed by Sophia Genetics with a sensitivity set at 2%.

3 | RESULTS

Several methods may be used to detect *CALR* exon 9 mutations. Using PCR amplification followed by fragment length analysis shows wild-type peak or alternate peaks according to the length of the sequence amplified and, hence, allows to detect the presence of nucleotide insertions or deletions. Indeed, in persons with wild-type *CALR*, only one peak is detected while *CALR*-mutated patients usually harbor two peaks (1 peak corresponding to the wild-type sequence and 1 shifted peak corresponding to the mutant sequence after nucleotide insertion or deletion). However, in the routine setting it is necessary to confirm the molecular alteration using Sanger sequencing, notably to precisely identify the subtype of mutation and to distinguish between frameshift and inframe deletions. Between January 2014 and June 2019, 1382 patients suspected of ET or MF were referred to our laboratory to search for *CALR* exon 9 mutations. Among these patients, we detected 571 patients (41%) with frameshift mutations and 14 patients with inframe variants: three patients with a 3 bp deletion (p. E381del or p.E399del) and 11 patients with a 9 bp deletion (p.D400_D402del in 1 case and p.D397_E399del in 10 cases) (Figure 1). The allelic fractions of the inframe variants were always around 50%, compatible with a germline origin, which was confirmed in two patients because the variant was detected in DNA extracted from nails. In line with the literature, these results strongly suggest that the inframe variants are not acquired and likely represent rare polymorphisms without impact on the CALR protein functions.

We then focused on rare situations where complex profiles in PCR followed by fragment length analysis may induce a risk of false interpretation. Among the 1382 patients that we have analyzed, we identified 3 distinct situations that could be misleading for MPN diagnosis. In these 3 patients, no mutations in *JAK2* or *MPL* were detected.

The patient A was a 49-year-old patient presenting with ET. As shown on Figure 2A, the fragment analysis of PCR products showed the presence of 2 additional peaks to the wild-type peak. According to the length measurement of these peaks, we could infer that a 5 bp insertion (around 36%) and a 52 bp deletion (around 5%) were present. This suggested the presence of 2 different mutations, that was confirmed by NGS analysis showing the presence of both a type 1 mutation (p.L367Tfs*46) with a variant allele frequency (VAF) of 3% and a type 2 mutation (p.K385Nfs*47) with a VAF of 43%. The analysis of the sequencing reads using IGV software allowed to show that both mutations were on separate alleles. Interestingly, both mutations were still detectable in a sample taken 1 year later but the type 1 mutation became undetectable by fragment analysis and NGS 18 months after the initiation of pegylated interferon alpha therapy.

The second case (patient B) was a 52-year-old MPN patient. As for patient A, the fragment size analysis revealed the presence of 3 peaks (Figure 2B). Intriguingly, the wild-type peak fraction was very small corresponding to only 10% of the total DNA analyzed. The additional peaks corresponded to deletions of 9 bp and 52 bp, respectively (confirmed by Sanger sequencing), representing 42% and 48% of the total DNA analyzed, respectively. A careful analysis of data led to the conclusion that this patient had a 9 bp inframe deletion on one allele (probably of germline origin) and then acquired a 52 bp deletion (type 1 mutation) on the other allele. The VAFs of each variant allowed to infer that patient B harbored two different cell populations both having the heterozygous −9 bp polymorphic deletion: one with the type 1 mutation representing 90% of cells while the remaining 10% had wild-type *CALR*.

The results of the fragment size analysis of patient C (a 73-year-old patient with myelofibrosis) also showed 3 peaks with no clear interpretation. Indeed, we observed a wild-type peak representing 50% of total DNA analyzed and 2 peaks corresponding to −64 bp and −52 bp representing 10% and 40% of total DNA, respectively (Figure 2C). To decipher whether the additional peaks corresponded to germline or somatic variants, we analyzed the DNA extracted from patient's nails. Only the wild-type allele peak

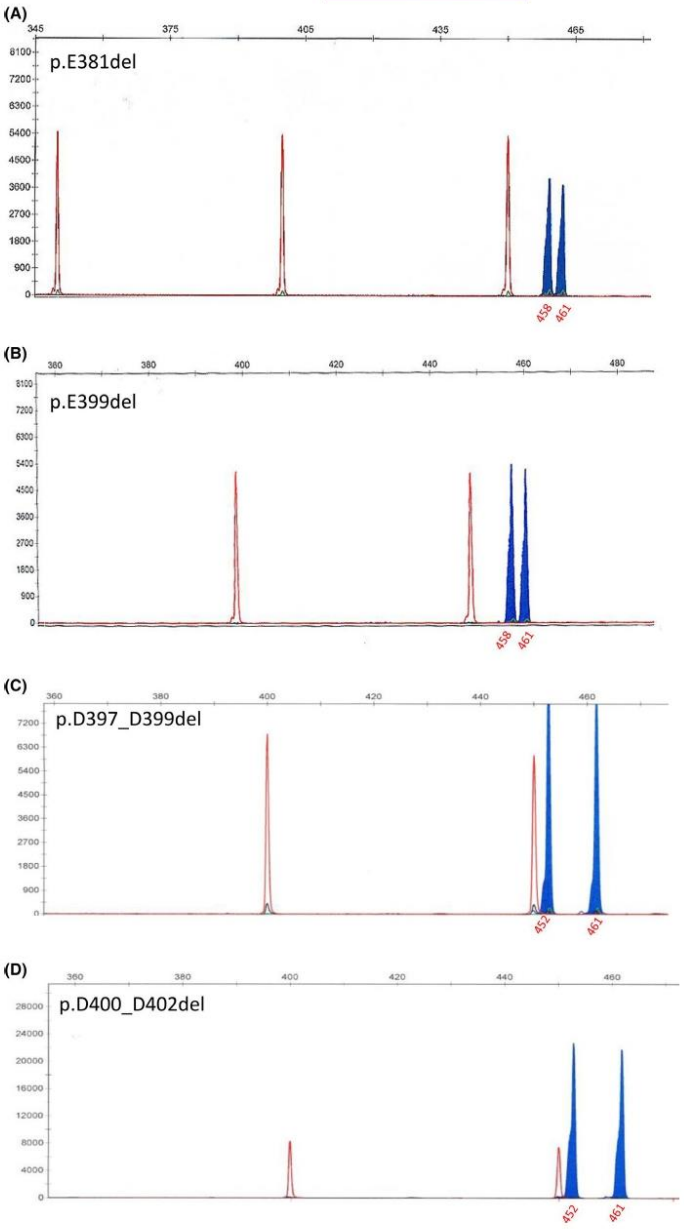


FIGURE 1 Polymerase chain reaction (PCR) fragment size analysis of patients with inframe deletions of the *CALR* gene

was found (Figure 2D), demonstrating that the 2 additional peaks corresponded to acquired mutations. The sample was then analyzed using a NGS approach that highlighted the presence of 2 distinct mutations. One 52 bp deletion (a type 1-like *CALR* mutation: c.1090_1141del) and one 12 bp deletion (c.1200_1211del) were, respectively, present as follows (Figure 2E): 26% of del52 alone and 14% of del12 associated with del52 on the same reads. The del12 was never observed alone, confirming the secondary acquisition of this mutation on del52 mutant alleles. The NGS data allowed to clarify the fragment size analysis, as the −64 bp peak

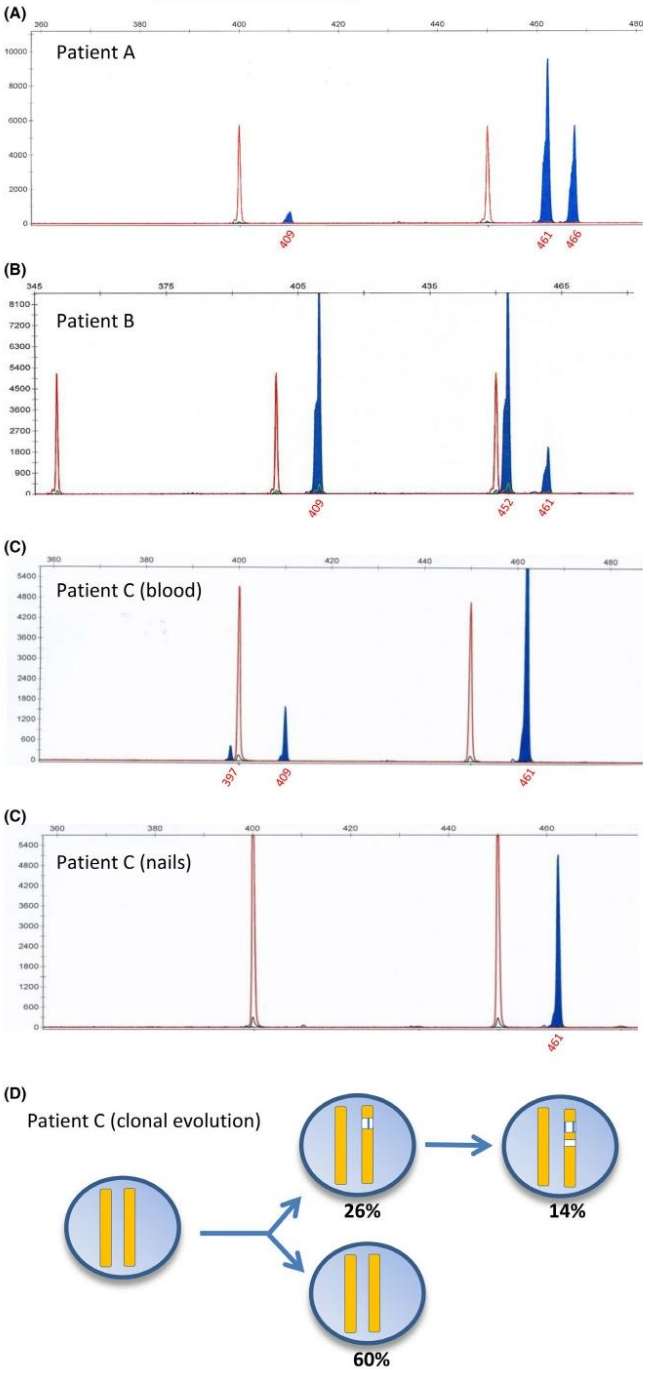


FIGURE 2 Polymerase chain reaction (PCR) fragment size analysis of patients with complex profiles

TABLE 1 C-terminal amino acid sequences of the CALR mutants identified in patient C

Wild-type	Q R L K E E E E D K K R K E E E E A E D K E D D E D K D E D E E D E E D K E E D E E E D V P G Q A K D E L

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;434:1144-1148.
2. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369:2379-2390.
3. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369:2391-2405.
4. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127:1307-1316.
5. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127:1325-1335.
6. 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;6:368-381.
7. Lim KH, Chang YC, Chiang YH, et al. Expression of CALR mutants causes mpl-dependent thrombocytosis in zebrafish. *Blood Cancer J*. 2016;6:e481.
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;127:1317-1324.
9. Nivarthi H, Chen D, Cleary C, et al. Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants. *Leukemia*. 2016;30:1759-1763.
10. Shide K, Kameda T, Yamaji T, et al. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia*. 2017;31:1136-1144.
11. Elf S, Abdelfattah NS, Baral AJ, et al. Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. *Blood*. 2018;131:782-786.
12. Araki M, Yang Y, Imai M, et al. Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation. *Leukemia*. 2019;33:122-131.
13. Pecquet C, Chachoua I, Roy A, et al. Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants. *Blood*. 2019;133:2669-2681.
14. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-2405.
15. Mansier O, Migeon M, Saint-Lézer A, et al. Quantification of the mutant CALR allelic burden by digital PCR: application to minimal residual disease evaluation after bone marrow transplantation. *J Mol Diagn*. 2016;18:68-74.
16. Lim KH, Chang YC, Gon-Shen Chen C, et al. Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis. *Blood Cancer J*. 2015;5:295.
17. Murugesan G, Guenther-Johnson J, Mularo F, Cook JR, Daly TM. Validation of a molecular diagnostic assay for CALR exon 9 indels in myeloproliferative neoplasms: identification of coexisting JAK2 and CALR mutations and a novel 9 bp deletion in CALR. *Int J Lab Hematol*. 2016;38:e284-297.
18. Szuber N, Lamontagne B, Busque L. Novel germline mutations in the calreticulin gene: implications for the diagnosis of myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol*. 2016;27:e203940.
19. 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;126:2585-2591.
20. Cassinat B, Giraudier S, Kiladjian JJ. How much does 2016 WHO classification of myeloproliferative neoplasms affect the clinic? *Expert Rev Hematol*. 2019;12:473-476.
21. Jones AV, Ward D, Lyon M, et al. Evaluation of methods to detect CALR mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*. 2015;39:82-87.
22. Mansier O, Luque Paz D, Ianotto JC, et al. Clinical and biological characterization of MPN patients harboring two driver mutations, a French intergroup of myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Am J Hematol*. 2018;93:E84-E86.
23. Nussenzveig RH, Pham HT, Perkins SL, Prchal JT, Agarwal AM, Salama ME. Increased frequency of co-existing JAK2 exon-12 or MPL exon-10 mutations in patients with low JAK2(V617F) allelic burden. *Leuk Lymphoma*. 2016;57:1429-1435.
24. Pietra D, Rumi E, Ferretti VV, et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2016;30(2):431-438.
25. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: mutation-enhanced international prognostic score system for transplantation-age patients with primary myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):310-318.

How to cite this article: Verger E, Maslah N, Schlageter M-H, et al. Pitfalls in CALR exon 9 mutation detection: A single-center experience in 571 positive patients. *Int J Lab Hematol*. 2020;00:1–6. https://doi.org/10.1111/ijlh.13282

ARTICLE N°3

Published Ahead of Print on May 15, 2020, as doi:10.3324/haematol.2020.252643.
Copyright 2020 Ferrata Storti Foundation.

haematologica
Journal of The Ferrata Storti Foundation

CCND2 mutations are infrequent events in BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasm patients

by Bruno Cassinat, Emmanuelle Verger, Nabih Maslah, Nicolas Gauthier, William Vainchenker, Stéphane Giraudier, and Jean-Jacques Kiladjian

Haematologica 2020 [Epub ahead of print]

Citation: Bruno Cassinat, Emmanuelle Verger, Nabih Maslah, Nicolas Gauthier, William Vainchenker, Stéphane Giraudier, and Jean-Jacques Kiladjian. CCND2 mutations are infrequent events in BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasm patients
Haematologica. 2020; 105:xxx
doi:10.3324/haematol.2020.252643

Publisher's Disclaimer.
E-publishing ahead of print is increasingly important for the rapid dissemination of science. Haematologica is, therefore, E-publishing PDF files of an early version of manuscripts that have completed a regular peer review and have been accepted for publication. E-publishing of this PDF file has been approved by the authors. After having E-published Ahead of Print, manuscripts will then undergo technical and English editing, typesetting, proof correction and be presented for the authors' final approval; the final version of the manuscript will then appear in print on a regular issue of the journal. All legal disclaimers that apply to the journal also pertain to this production process.

CCND2 mutations are infrequent events in BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasm patients

Bruno Cassinat[1,2,3], Emmanuelle Verger[1,2] , Nabih Maslah[1,2] , Nicolas Gauthier[4], William Vainchenker[3,5], Stéphane Giraudier[1,2,3] and Jean-Jacques Kiladjian[2,3,4]

[1]AP-HP, Hôpital Saint-Louis, laboratoire de Biologie Cellulaire, Paris, France

[2]Université de Paris, U1131 INSERM, IRSL, F-75010 Paris, France

[3]Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France.

[4]Centre d'Investigations Cliniques, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

[5]Université de Paris-Saclay, INSERM UMR1287, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Correspondance to : Pr Jean-Jacques KILADJIAN
Centre d'Investigations Cliniques
Hopital Saint-Louis
1 avenue Claude Vellefaux, 75010 Paris, France
E-mail : jean-jacques.kiladjian@aphp.fr

Running title : CCND2 mutations in MPN patients

Classical or BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal diseases originating from the acquisition at the stem cell level of a phenotype driver mutation affecting *JAK2*, *MPL* or *CALR* genes. MPNs are comprised of three illnesses: essential thrombocythemia (ET), polycythemia vera (PV) and primary myelofibrosis (PMF). These diseases are characterized by recurrent complications including severe thromboembolic events and secondary transformation to myelofibrosis or acute myeloid leukemia. Large efforts have been undertaken to better define the prognosis of MPN patients and understand the reasons for the heterogeneous clinical evolution among these patients. Thanks to the development of next generation sequencing (NGS) techniques, additional molecular alterations have been discovered and considered in the delineation of risk categories in MPNs.[1] For example, some high risk mutations have been identified and most studies highlighted that the presence of a high number of mutations in a single patient is correlated to poorer outcome. The most frequent mutations are found in genes regulating the epigenetics, the intracellular cell signaling, the transcription factors or the spliceosome, making the regulation of gene expression the main target of the molecular alterations identified in MPNs.

The *CCND2* gene on chromosome 12 encodes the cyclin D2 cell cycle regulator which has been shown to be deregulated in cancer. Cyclin D2 overexpression has been reported in solid tumors.[2] In hematopoietic malignancies, translocations involving the *CCND2* gene are found in lymphomas while mutations in the *CCND2* gene have been reported in acute myeloid leukemias (AML), mainly in core-binding factor AML.[3] Finally, *de novo* germline *CCND2* mutations are causative for a malformation syndrome called megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus (MPPH).[4] Interestingly, both the mutations reported in cancer and in MPPH target a very narrow region coding for amino acids between Gln265 and Val284 with a hot-spot on Thr280 and Pro281 which are conserved amino acids involved in Cyclin D2 degradation.[4,5] The reported mutations are both missense or nonsense mutations which have been shown to increase the stability of Cyclin D2 and hence the cellular proliferation.[3,4]

Because *CCND2* mutations have recently been described in one patient with triple-negative PMF[6] and 4 patients with atypical chronic myeloid leukemia (aCML) or myeloproliferative neoplasms unclassifiable (MPNu),[7] we aimed at evaluating the frequency of such mutations in a large cohort of MPN patients. We prospectively screened 708 samples from 589 patients with classical MPNs (233 ET; 187 PV; 169 MF) using a capture-based custom NGS panel (Sophia Genetics) targeting 36 myeloid genes (*ABL1; ASXL; BRAF; CALR; CBL; CCND2; CEBPA; CSF3R; CUX1; DNMT3A; ETNK1 ; ETV6; EZH2; FLT3; HRAS; IDH1; IDH2; IKZF1; JAK2; KIT; KRAS; MPL; NFE2; NPM1; NRAS; PTPN11; RUNX1; SETBP1; SF3B1; SH2B3; SRSF2; TET2; TP53; U2AF1; WT1; ZRSR2)*. Of note, the full coding sequence of the CCND2 gene was captured. Libraries were prepared on 200ng extracted from whole blood DNA

(Qiagen) and the sequencing was performed on a MiSeq instrument (Illumina). Bioinformatics were realized at Sophia Genetics (Switzerland) using the SOPHIA DDM software and significant variants were retained with a sensitivity of 1%. The study was accepted by the local institutional review board and patients have given informed consent for the study. The driver mutations were present with frequencies similar to those reported in the literature (Table 1). Whereas PV patients were found positive for JAK2 mutations (90% of JAK2V617F and 2 % of exon 12 mutations), ET and MF patients were positive for JAK2V617F (53% in both groups), MPL exon 10 (4% and 8% respectively) or CALR exon 9 mutations (26% and 27% respectively). Apart from the driver mutation, the most frequently found additional mutations targeted the TET2, DNMT3A and ASXL1 genes (Table 1). We found *CCND2* mutations at low variant allelic frequencies (VAFs) in 4 patients (0.7% of our cohort), 1 with PV, 1 with MF and 2 with ET (Table 2). The mutations identified were missense mutations at hot-spot amino acids Thr280 and Pro281 and one nonsense mutation (p.Ser271*). The driver mutations present in these 4 patients included *CALR*, *JAK2* and *MPL* mutants, excluding a possible association with one particular driver gene. Of note, the *CCND2* mutation was present as the only additional mutation in 2 patients whereas 2 to 4 additional mutations were present in one ET and one MF patient respectively (Table 2). We had the opportunity to analyze 3 sequential samples over 15 months in one patient with MF (#4). We observed that the *CCND2* mutant VAF significantly increased from 2.4 to 5.1%, while the patient was under treatment with ruxolitinib. This patient did not present evidence of disease progression during these 15 months.

It is nowadays largely acknowledged that variability in patients' prognosis is mainly explained by the pattern of acquired molecular alterations that may be very different from one patient to another. A clonal evolution of the disease before the occurrence of transformation to MF or leukemia has been clearly demonstrated, making essential to precisely define the clonal architecture of patients. Although rare (less than 1% of our cohort) the *CCND2* mutations may participate to the disease evolution in some patients. Indeed, as D-type cyclins such as D1, D2 and D3 cyclins are essential partners for cyclin-dependent kinases (mostly CDK4 and CDK6), the mutations targeting *CCND2* described in this study are likely to induce a deregulation of the cell cycle and may participate in the development of more aggressive clones. This deserves further studies to assess the specific role of these rare mutations.

Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of the Laboratoire de Biologie Cellulaire for excellent technical help and the French Intergroup for Myeloproliferative neoplasms (FIM) for thoughtful discussions.

Clinical and biological features	N (%) or median (range) N= 589
Age (years)	63 (19 – 94)
Male	270 (46)
MPN subtype	
ET	233 (39)
PV	187 (32)
MF	169 (29)
Driver mutations	
JAK2	376 (64)
MPL	23 (4)
CALR	99 (17)
Other mutations	
TET2	175 (30)
DNMT3A	145 (25)
ASXL1	109 (18)
SH2B3	50 (8)
NFE2	44 (7)
TP53	51 (9)
EZH2	30 (5)
SF3B1	21 (4)
IDH1/2	19 (3)
SRSF2	14 (2)
NRAS	11 (2)
KRAS	10 (2)

Table 1 : Patients' characteristics

Patient	Age	Gender	Diagnosis	Driver mutation	CCND2 mutation	VAF	Other mutations (VAF)	Time from diagnosis to NGS (months)	Treatments received
#1	41	F	ET	CALR type 1	c.839C>T p.T280I	2,4%	None	107	None
#2	48	M	PV	JAK2 p.V617F	c.838A>G p.T280A	1%	None	37	Interferon alpha
#3	41	F	ET	JAK2 p.V617F	c.812C>A p.Ser271*	1%	CBL p.C381Y (5%) NRAS p.G12V (6%)	69	Ruxolitinib
#4	75	M	MF	MPL p.W515L	c.842C>G p.P281R	2,4% to 5,1%	CBL p.Y371* (11%) IDH1 p.R132H (37%) SRSF2 p.P95L (39%) TET2 p.P739Lfs*12 (6%)	25	Ruxolitinib

Table 2: Characteristics of patients with MPN and *CCND2* mutations

References

1- Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2018;36(4):310-318.
2- Ding ZY, Li R, Zhang QJ, et al. Prognostic role of cyclin D2/D3 in multiple human malignant neoplasms: A systematic review and meta-analysis. Cancer Med. 2019;8(6):2717-2729.
3- Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. Nat Genet. 2016;48(12):1551-1556.
4- Mirzaa G, Parry DA, Fry AE, et al. De novo CCND2 mutations leading to stabilization of cyclin D2 cause megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus syndrome. Nat Genet. 2014;46(5):510-515.
5- Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Schwind S, et al. Mutations in the CCND1 and CCND2 genes are frequent events in adult patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. Leukemia. 2017;31(6):1278-1285.
6- Chang YC, Lin HC, Chiang YH, et al. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Med Oncol. 2017;34(5):83.
7- Khanna V, Eide CA, Tognon CE, et al. Recurrent cyclin D2 mutations in myeloid neoplasms. Leukemia. 2017;31(9):2005-2008.

ARTICLE N°4

JEM Journal of Experimental Medicine

BRIEF DEFINITIVE REPORT

JAK2^{V617F} myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML

Tracy Dagher[1,2,3,4*], Nabih Maslah[6,7*], Valérie Edmond[1,2,3,4*], Bruno Cassinat[4,6,7], William Vainchenker[1,2,3,4], Stéphane Giraudier[6,7], Florence Pasquier[1,2,5], Emmanuelle Verger[6,7], Michiko Niwa-Kawakita[8,9], Valérie Lallemand-Breitenbach[8,9], Isabelle Plo[1,2,3,4], Jean-Jacques Kiladjian[4,6,10**], Jean-Luc Villeval[1,2,3,4**], and Hugues de Thé[8,9,11**]

Interferon α (IFNα) is used to treat JAK2^{V617F}-driven myeloproliferative neoplasms (MPNs) but rarely clears the disease. We investigated the IFNα mechanism of action focusing on PML, an interferon target and key senescence gene whose targeting by arsenic trioxide (ATO) drives eradication of acute promyelocytic leukemia. ATO sharply potentiated IFNα-induced growth suppression of JAK2^{V617F} patient or mouse hematopoietic progenitors, which required PML and was associated with features of senescence. In a mouse MPN model, combining ATO with IFNα enhanced and accelerated responses, eradicating MPN in most mice by targeting disease-initiating cells. These results predict potent clinical efficacy of the IFNα+ATO combination in patients and identify PML as a major effector of therapy, even in malignancies with an intact *PML* gene.

Introduction

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are chronic stem cell diseases characterized by enhanced production of differentiated blood cells. Most MPN cases are characterized by mutations in *JAK2* that result in the expression of the constitutive active mutant protein kinase JAK2^{V617F} and its downstream cytokine signaling pathways. The *JAK2^{V617F}* mutation may yield polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia, or primary myelofibrosis (MF), the three diseases that constitute classic *BCR-ABL*–negative MPN. PV, essential thrombocythemia, and MF share common complications, including thrombosis, hemorrhage, and transformation to acute myeloid leukemia (Pasquier et al., 2014; Vainchenker and Kralovics, 2017). Animal models with hematopoietic cells expressing JAK2^{V617F} recapitulate many aspects of the human disease, in particular a PV-like disorder evolving into MF. These animal models have allowed exploration of the biology of JAK2^{V617F} and potential therapeutic approaches (Hasan et al., 2013; Mullally et al., 2013). Apart from phlebotomy in PV, current therapeutic approaches in MPN are based on cytoreductive therapies, JAK2 inhibitors, and IFNα (Spivak, 2019). Although the JAK inhibitor ruxolitinib provides some clinical benefits to MPN patients, it has no significant effect on disease progression and on the JAK2^{V617F} clone. IFNα can target the JAK2^{V617F} clone and yield complete molecular response in 8–20% of patients (Kiladjian et al., 2008; Verger et al., 2018). Yet the molecular mechanisms underlying IFNα therapy remain incompletely understood, precluding improvement of its efficacy (Austin et al., 2020; Hasan et al., 2013; Kiladjian et al., 2016; Mullally et al., 2013).

The PML protein is a member of the TRIM family of ubiquitin/SUMO ligases discovered through its implication in acute promyelocytic leukemia (APL). *PML* is potently transcriptionally activated by IFNs (Stadler et al., 1995). PML has drawn attention from cell biologists due to its ability to nucleate membrane-less organelles, PML nuclear bodies (NBs; Hsu and Kao, 2018; Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2018). PML is a sensor for oxidative stress and is essential for induction of senescence (Niwa-Kawakita et al., 2017; Pearson et al., 2000; Vernier et al., 2011). While PML-NBs are disrupted in APL, their reformation drives the therapeutic response (Ablain et al., 2014; Lehmann-Che et al., 2014). Arsenic trioxide (ATO), a curative targeted therapy of APL, directly binds PML to enforce NB formation by promoting PML oxidation and multimerization (Jeanne et al., 2010; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 1997). PML-dependent growth arrest and senescence require NB formation (Ivanschitz et al., 2015) so that ATO can enhance some PML activities, notably in IFNα-primed cells (Quignon et al., 1998).

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1287, Gustave Roussy, Villejuif, France; [2]Université Paris-Saclay, Gustave Roussy, Villejuif, France; [3]Gustave Roussy, Villejuif, France; [4]Laboratoire d'Excellence GR-Ex, Paris, France; [5]Département d'Hématologie, Gustave Roussy, Villejuif, France; [6]Université de Paris, INSERM UMR-S1131, Institut de Recherche Saint-Louis (IRSL), Hôpital Saint-Louis, Paris, France; [7]Service de Biologie Cellulaire, Assistance Publique Hôpitaux de Paris (APHP), Hôpital Saint-Louis, Paris, France; [8]INSERM U944, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR7212, IRSL, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; [9]Collège de France, Paris Sciences et Lettres Research University, INSERM U1050, CNRS UMR7241, Paris, France; [10]Centre d'Investigations Cliniques, APHP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France; [11]Service de Biochimie, APHP, Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

*T. Dagher, N. Maslah, and V. Edmond contributed equally to this paper; **J.-J. Kiladjian, J.-L. Villeval, and H. de Thé contributed equally to this paper; Correspondence to Hugues de Thé: hugues.dethe@inserm.fr; Jean-Jacques Kiladjian: jean-jacques.kiladjian@aphp.fr; Jean-Luc Villeval: Jean-luc.villeval@gustaveroussy.fr.

© 2020 Dagher et al. This article is available under a Creative Commons License (Attribution 4.0 International, as described at https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Check for updates

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

Here, we explored the hypothesis that PML may be a downstream effector of IFNα therapy in MPN. We found that ATO greatly enhances the ability of IFNα to eliminate JAK2^{V617F} MPN stem cells. This elimination is PML dependent and is associated with features of senescence. Our results lay the groundwork for IFNα+ATO-based curative approaches of MPN.

Results and discussion

IFNα or ATO enhances PML-NB formation preferentially in JAK2^{V617F} cells

We first explored the PML-NB status of cells expressing JAK2^{V617F}. We observed significantly more and larger PML-NBs in CD34$^+$ cells from JAK2^{V617F} MF patients compared with control CD34$^+$ cells (Fig. 1 a). PML-NB number and staining intensity increased significantly upon IFNα and/or ATO treatment of CD34$^+$ cells. A further significant increase of NB staining intensity was found when these cells were treated with both drugs (Lallemand-Breitenbach et al., 2001; Quignon et al., 1998; Zhu et al., 1997; Fig. 1 a). Using human isogenic UT-7 cell lines with or without exogenous JAK2^{V617F}, we confirmed that PML-NB formation was consistently more pronounced with JAK2^{V617F} (Fig. S1 a). Mouse bone marrow (BM) Lin$^-$c-Kit$^+$ (LK) cells harvested from *Jak2*^{V617F} knock-in (KI) mice exhibited similar PML-NB numbers as BM LK cells from control littermates. However, after ATO, IFN, or IFN+ATO treatments, *Jak2*^{V617F} LK cells consistently contained more PML-NBs than did *Jak2*^{WT} LK cells (Fig. 1 b). Western blot analyses performed on these LK cells demonstrated an increased PML level upon ex vivo IFNα treatment (Fig. 1 c). ATO triggered an increase in sumoylated forms of PML accompanied by some decrease in the un-sumoylated PML abundance (Lallemand-Breitenbach et al., 2001, 2008; Fig. 1 c). Importantly, both the basal and IFNα-induced PML levels were consistently higher in LK cells derived from *Jak2*^{V617F} KI mice compared with their WT counterparts (Fig. 1 c). Overall, JAK2^{V617F} expression or IFNα exposure increases PML expression, while ATO enforces its NB formation, suggestive of increased sensitivity of mutated cells for PML-controlled processes.

ATO enhances IFNα-driven growth suppression in JAK2^{V617F} progenitors

We first investigated the proliferation of UT-7 cells expressing or not exogenous JAK2^{V617F} when treated with increasing concentrations of ATO alone or together with a suboptimal concentration of IFNα (200 IU/ml; Fig. S1 b). Growth inhibition after 3 d was consistently more pronounced in the presence of JAK2^{V617F} (Fig. 2 a). These data were supported by a decreased proportion of cells in S phase, with an enhanced effect between ATO and IFNα ($P < 0.001$) in UT-7 JAK2^{V617F} cells only (Fig. S1 c).

We then assessed the effect of these drugs on the clonogenic potential of primary cells derived from MF or PV patients, exploring the balance between normal and mutant progenitors by genotyping of individual colonies (Fig. 2, b and c). With cells from the 10 MF patients explored, a decrease in erythroid colony number was observed upon treatment with IFNα, but this effect was considerably enhanced by the IFNα+ATO combination. Importantly, while the proportion of JAK2^{V617F} colonies was not altered by either IFNα or ATO alone, it was significantly decreased ($P < 0.01$) by the combination (Fig. 2 b). Similarly, in PV patient samples ($n = 7$), IFNα decreased the number of colonies in a dose-dependent manner, and the addition of ATO significantly enhanced this effect (Fig. 2 c and Fig. S1 d). Importantly, the number of JAK2 mutated colonies decreased after treatment with the combination ($P = 0.01$), but not with IFNα alone (Fig. 2 c). Apart from clonogenic potential, the growth of burst-forming unit–erythroid progenitors was also clearly impacted, as the size of the colonies decreased with IFNα and decreased further with IFNα+ATO (Fig. 2 d). In contrast, IFNα, ATO, and their combination had only moderate effects on the growth of hematopoietic progenitors from healthy individuals or JAK2^{WT} progenitors derived from MF and PV patients (Fig. 2, b and c; and Fig. S1, d and e).

We then explored the anti-clonogenic activity of IFNα and ATO in mouse *Jak2*^{V617F} and *Jak2*^{WT} hematopoietic progenitors. BM cells from *Jak2*^{V617F} KI and *Jak2*^{WT} mice were seeded in methylcellulose with cytokines, IFNα, and/or ATO. The *Jak2*^{V617F} colony number decreased in response to the IFNα+ATO combination at suboptimal (200 IU) or maximal (1,000 IU) IFNα concentrations, in contrast to *Jak2*^{WT} cells (Fig. 2 e). Moreover, the number or proportion of *Jak2* mutant colonies was synergistically decreased by IFNα and ATO, while no single agent had a significant effect. Collectively, ATO significantly enhances the growth-suppressive effects of IFNα on JAK2^{V617F} progenitors ex vivo.

IFNα+ATO clears JAK2^{V617F} disease-initiating cells in vivo

We next explored the potency of the IFNα+ATO combination in vivo using a *Jak2*^{V617F} mouse model (experimental design in Fig. S2), wherein long-term IFNα treatment (14 wk) is required to clear disease-initiating cells in some mice (Hasan et al., 2013). Using an optimized schedule of 5 mg/kg ATO every 2 d with or without IFNα for 8 wk, we found that ATO clearly improved IFNα efficacy to clear MPN (Fig. 3). Although ATO on its own had only modest effects on WBC counts and spleen size, its combination with IFNα significantly accelerated and amplified IFNα-driven hematological response, as assessed by the decrease in WBCs, hematocrit, and splenomegaly (Fig. 3, a and c). Moreover, the addition of ATO significantly increased the molecular response to IFNα, as assessed on blood GFP$^+$, *Jak2*^{V617F} granulocytes (Gr-1/CD11b), platelets (CD42), and RBC (Ter119) counts (Fig. 3 b). Finally, at the time of sacrifice, combined IFNα+ATO treatment had dramatically decreased the percentage of lineage-negative (Lin$^-$), LK, Lin$^-$Sca1$^+$c-Kit$^+$ (LSK), and SLAM$^+$ (signaling lymphocyte activation molecule) cells from *Jak2*^{V617F} KI origin, demonstrating that the combination is considerably more potent than IFNα alone for targeting *Jak2*^{V617F} stem cells (Fig. 3 d).

To substantiate any decline in disease-initiating cells, we transplanted whole BM cells (3×10^6) from treated mice into secondary recipient mice and monitored disease occurrence (Fig. 3 e). Most mice transplanted with BM cells from untreated ($n = 15/17$) or ATO-treated ($n = 12/12$) mice developed the disease, while ~60% ($n = 13/22$; $P = 0.06$) of mice transplanted with BM

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

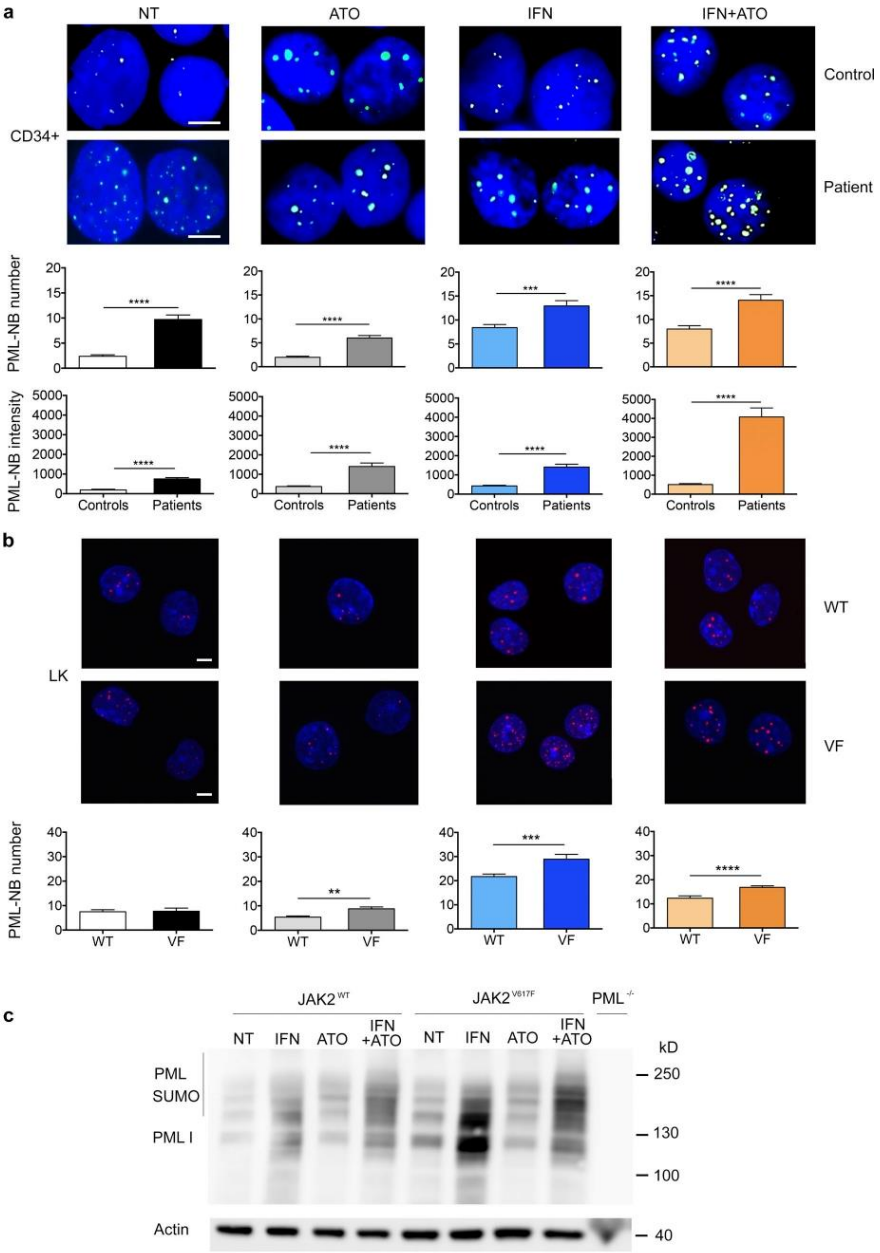


Figure 1. **IFNα+ATO enforces potent NB formation in JAK2^{V617F} cells. (a)** Representative immunofluorescence images (upper panel) and quantification of PML-NB numbers and intensities (lower panel) in CD34$^+$ cells from a healthy donor (control) and a JAK2^{V617F} MF patient, not treated (NT) or treated in vitro with ATO (1 µM) for 1 h, IFNα (1,000 IU/ml) for 24 h, or both (lower panel represents the pooled results of three patients and controls). Two-tailed unpaired

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

Student's *t* test. Scale bars = 5 µm. **(b)** Same as panel a in LK cells from *Jak2*^{V617F} KI mice (VF) or *Jak2*^{WT} littermates (WT) not treated or treated in vitro with ATO (0.3 µM) for 1 h, IFNα (1,000 IU/ml) for 22 h, or both (n = 6). Scale bars = 10 µm. **(c)** Western blot analysis of PML in LK cells from *Jak2*^{V617F} KI, *Jak2*^{WT} littermate, or *Pml*$^{-/-}$ mice not treated or treated with ATO for 1 h, IFNα for 22 h, or both (n = 3). The values shown are mean ± SEM; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

from mice treated with IFNα alone became ill (Fig. 3 e). In contrast, none of the mice transplanted with BM from mice treated with the IFNα+ATO combination (n = 0/18; P = 0.0001) developed the disease, strongly suggesting that the combined treatment may have long-term efficacy in primary recipients. We thus monitored disease recurrence in primary animals after treatment discontinuation (Fig. 3 f). All the NT mice remained ill (n = 11/11), while 73% of the mice treated with IFNα alone relapsed (n = 11/15; P = 0.2) at 9 wk after treatment discontinuation. More than half of the mice (53%) treated with the combination (n = 8/15; P = 0.007) remained disease-free 9 wk after treatment discontinuation. Collectively, these results establish that ATO accelerates and amplifies the anti-neoplastic response induced by IFNα, targeting *Jak2*^{V617F} stem cells, with long-term clearing of the disease in a substantial number of animals.

PML drives IFNα+ATO responses

The IFNα+ATO combination maximizes PML-NB formation (Quignon et al., 1998). To explore any role of PML in the action of the IFNα+ATO combination, we first examined the role of PML knockdown in CD34$^+$ cells from *JAK2*^{V617F} MF patients. After transduction with lentiviruses expressing an shRNA efficiently targeting PML (Ivanschitz et al., 2015; Niwa-Kawakita et al., 2017), CD34$^+$ cells were sorted for GFP expression, seeded in semisolid cultures, and treated or not with IFNα and/or ATO. Remarkably, the decrease in mutant colony formation upon IFNα+ATO treatment was severely blunted by PML down-regulation (Fig. 4 a). These results strongly suggest that the ability of IFNα+ATO to target the clonogenic activity of JAK2^{V617F} progenitors is PML dependent.

To further explore PML contributions to IFNα or/and ATO selective elimination of JAK2^{V617F} hematopoietic stem cells (HSCs) in vivo, we generated *Jak2*^{V617F}/*Pml*$^{-/-}$ mice and transplanted syngenic mice with a mixture of *Jak2*^{V617F}/*Pml*$^{-/-}$ and *Jak2*^{V617F}/*Pml*$^{+/+}$ BM cells (Fig. 4 b). 5 wk after transplantation, mice were treated with IFNα and/or ATO for 12 wk. In this experimental setup, if *Pml* was required for therapy response, its absence should yield a progressive survival advantage to *Jak2*^{V617F}/*Pml*$^{-/-}$ cells. In NT animals, MPN rapidly developed (Fig. 4 c). The IFNα+ATO combination or IFNα alone elicited a rapid decrease of leukocytosis, thrombocytosis, and erythrocytosis (Fig. 4 c). A time-dependent enrichment of *Jak2*^{V617F}/*Pml*$^{-/-}$ granulocytes, platelets, and RBCs occurred in response to combined IFNα+ATO therapy (Fig. 4 d), while this enrichment was observed for IFNα alone only in *Jak2*^{V617F}/*Pml*$^{-/-}$ RBCs. This key observation demonstrates *Pml*-dependent targeting of HSCs by IFNα+ATO in vivo and a partial *Pml* dependency for IFN response. Collectively, these results demonstrate that PML is involved in the elimination of JAK2^{V617F} progenitors or stem cells in response to the IFNα+ATO combination.

IFNα+ATO drives PML-dependent senescence ex vivo

In the syngenic UT-7 model, IFNα and/or ATO induced SA-β–galactosidase activity and expression of senescence-associated genes, which were significantly enhanced in JAK2^{V617F}-expressing cells (Fig. S3, a and b). We then compared the behavior of CD34$^+$ hematopoietic progenitors from healthy individuals and MPN patients in a condition of megakaryocytic differentiation. Normal cells exhibited massive spontaneous senescence, while those derived from MF patients did not (Besancenot et al., 2010). Yet IFNα+ATO treatment restored senescence in MF patient cells, as assessed by SA-β–galactosidase activity and expression of senescence-associated genes (Fig. 5, a and b; and Fig. S3 c). Induction of senescence by the IFNα+ATO combination in primary cultures of progenitors from JAK2^{V617F} MF patients was abrogated upon lentiviral-introduced shRNA targeting PML (Fig. 5, c–e).

We similarly explored ex vivo IFNα and ATO treatments of primary BM progenitor cells derived from *Jak2*^{V617F} KI or littermate *Jak2*^{WT} mice, deficient or not for *Pml*. The expression of senescence-associated genes (*Cdkn2a*, *Pai1*, and *Gdf15*) was significantly more induced by the IFNα+ATO combination in *Jak2*^{V617F} Lin$^-$ cells than in *Jak2*^{WT} Lin$^-$ cells, and the absence of *Pml* blunted their induction (Fig. 5 f). Collectively, the IFNα+ATO combination preferentially induces senescence markers in JAK2^{V617F} primary cells, at least in part through PML.

Although IFNα targets JAK2^{V617F} hematopoietic progenitors, in patient or mouse models its long-term efficacy remains modest (Austin et al., 2020; Gisslinger et al., 2020; Hasan et al., 2013; Kiladjian et al., 2006; Mullally et al., 2012). Several clinical and preclinical studies have attempted to improve IFNα efficacy, for example, through combinations with MDM2 or JAK2 inhibitors (Austin et al., 2020; Lu et al., 2014; Mascarenhas et al., 2019). We demonstrate that the IFNα+ATO combination specifically targets the *Jak2*^{V617F} disease-initiating cells in vivo, with a much higher potency than IFNα alone. These cooperative effects were observed in a wide variety of JAK2^{V617F}-expressing models, including primary hematopoietic progenitors, suggestive of therapeutic relevance. In our setting, IFNα has cell-autonomous activity, clearly independent from its action on anti-tumor immunity (Zitvogel et al., 2015). We demonstrate that improvement of IFNα efficacy by ATO primarily relies on PML and provide some evidence for a contribution of senescence. PML-NBs promote p53 activation and E2F shutoff (Vernier and Ferbeyre, 2014), opposing tumor development in multiple settings (Salomoni and Pandolfi, 2002). PML-NBs may also control apoptosis (Giorgi et al., 2010; Takahashi et al., 2004). Mechanistically, these growth-suppressive effects could rely on promotion of post-translational modifications—notably

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

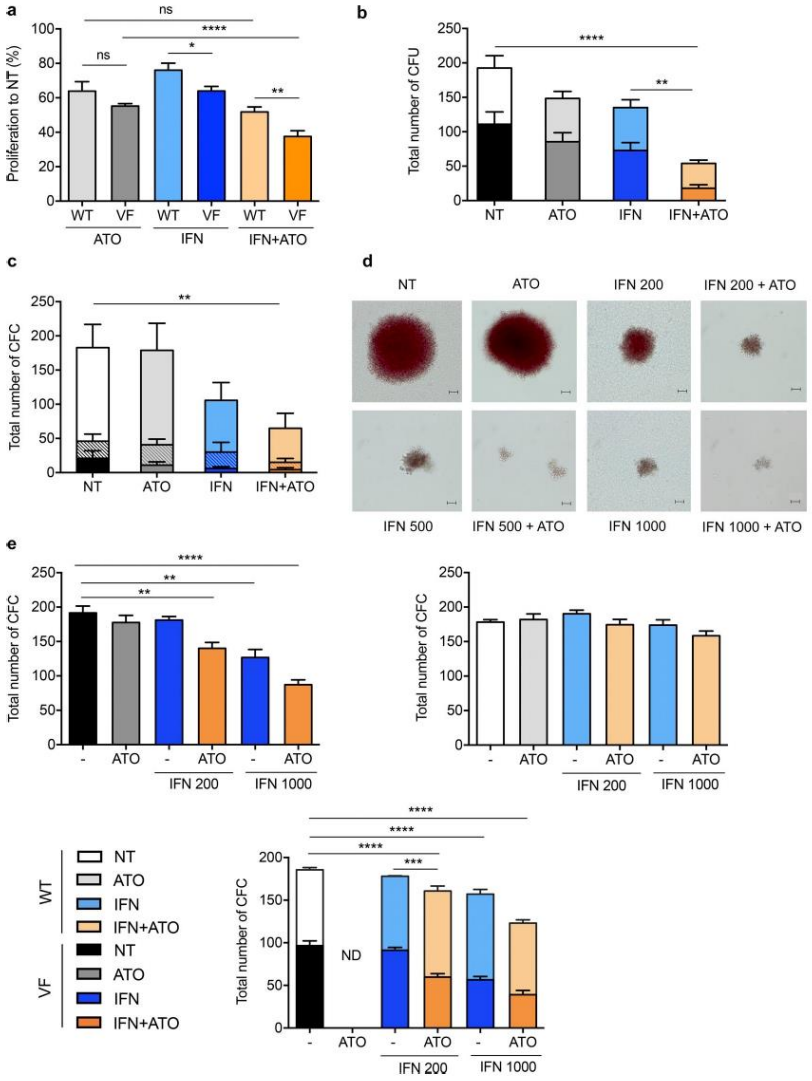


Figure 2. **Arsenic enhances IFNα-driven growth suppression in JAK2^{V617F} cells in vitro. (a)** Relative proliferation of *JAK2^{WT}* (WT) UT-7 cells or UT-7 cells expressing ectopic JAK2^{V617F} (VF) treated with ATO (0.25 µM), IFNα (1,000 IU/ml), or both for 3 d (n = 3). **(b)** Numbers of *JAK2^{WT}* (WT, light shade) and *JAK2^{V617F}*-positive (VF, dark shade) erythroid colonies from CD34$^+$ patient cells cultured for 14 d. Triplicate cultures from 10 *JAK2^{V617F}* MF patients untreated (NT) or treated with ATO (0.1 µM), IFNα (200 IU/ml), or both. **(c)** Numbers of *JAK2$^{WT/WT}$* (WT; light shade), *JAK2$^{WT/V617F}$* (WT/VF; patterned), and *JAK2$^{V617F/V617F}$* (VF; dark shade) erythroid and myeloid colonies counted from CD34$^+$ patient cells cultured for 14 d. Results represent duplicate cultures from seven PV patients untreated or treated with ATO (0.1 µM), IFNα (1,000 IU/ml), or both. **(d)** Erythroid colonies formed from CD34$^+$ cells isolated from a PV patient taken after 14 d of culture: untreated or treated with ATO (0.1 µM), IFNα (200 or 1,000 IU/ml), or both. Scale bars = 50 µm. **(e)** Numbers of erythroid and myeloid colonies after 7 d of culture of 5 × 10^4 BM cells collected from *Jak2^{V617F}*; *Ubi*GFP KI mice (left), from *Jak2^{WT}* littermate mice (right), or a 1:1 mixture from both, mimicking the situation found in patients (bottom). Cultures were untreated or treated with ATO (0.1 µM), IFNα (200 or 1,000 IU/ml), or both. Three independent experiments (except for ATO n = 1) treated with ATO (0.2 µM), IFNα (200 or 1,000 IU/ml as indicated) with or without ATO. Two-way ANOVA. Error bars represent the mean ± SEM. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001. ns, not significant; CFC, colony-forming cell.

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

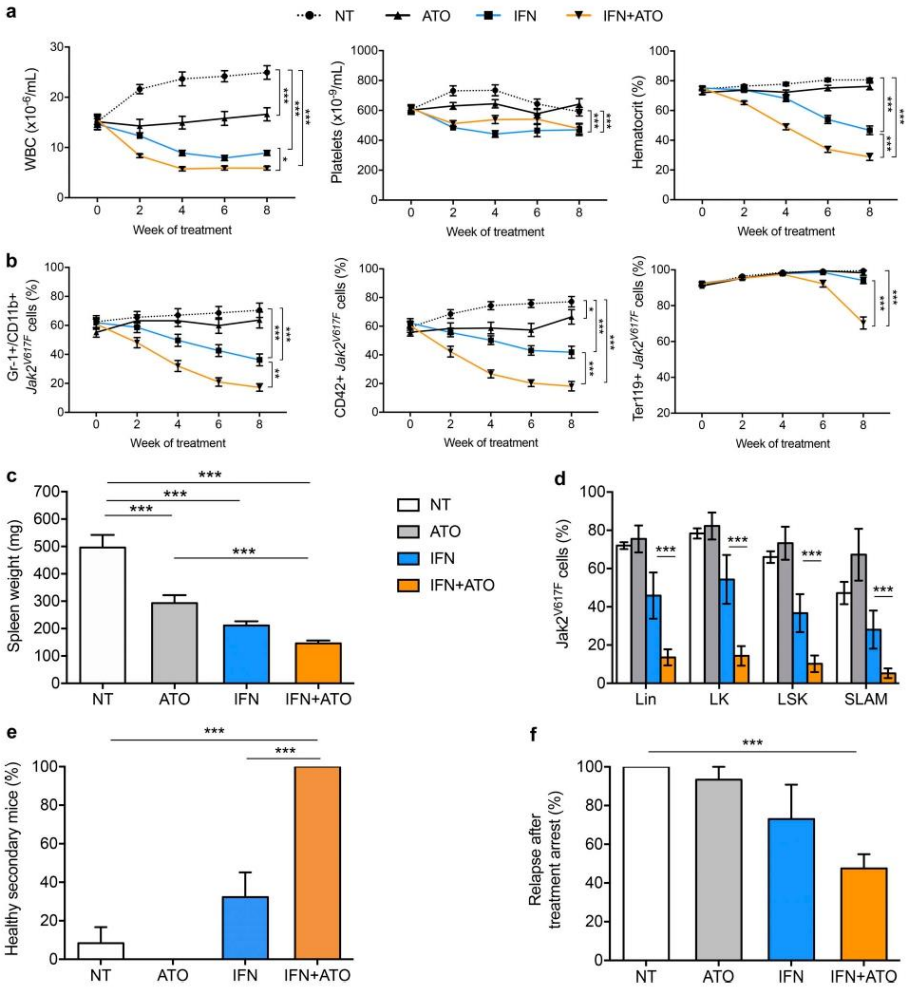


Figure 3. **The IFNα+ATO combination efficiently targets *Jak2*^{V617F} disease in vivo. (a)** Hematological parameters of mice bearing *Jak2*^{V617F} disease were obtained from four independent experiments (untreated, *n* = 25; ATO, *n* = 19; IFNα, *n* = 28; and IFNα+ATO, *n* = 29; Fig. S2 for protocol details). One-way ANOVA with multiple comparisons. **(b)** Percentage of GFP-positive *Jak2*^{V617F} Gr-1$^+$/CD11b$^+$ cells (granulocytes), CD42$^+$ cells (platelets), and Ter119$^+$ cells (RBCs) in chimeric recipients during treatment. **(c)** Spleen weight after treatment discontinuation obtained from four independent experiments (untreated [NT], *n* = 12; ATO, *n* = 8; IFNα, *n* = 11; and IFN+ATO, *n* = 19). Unpaired two-sided Student's *t* test. **(d)** Percentage of *Jak2*^{V617F} cells (untreated, *n* = 5; ATO, *n* = 4; IFNα, *n* = 4; and IFNα+ATO, *n* = 9). Unpaired two-sided Student's *t* test. **(e)** Percentage of healthy secondary recipients evaluated at 8–15 wk after BM transplantation (four independent experiments: untreated, *n* = 17; ATO, *n* = 12; IFNα, *n* = 22; and IFNα + ATO, *n* = 18). Mice were considered healthy based on the hematocrit (<50%) and the absence of *Jak2*^{V617F} cells (GFP labeled) in granulocytes (Gr-1$^+$/CD11b$^+$) and platelets (CD42$^+$). One-way ANOVA with multiple comparisons. **(f)** Percentage of relapses 9 wk after treatment completion in primary recipients. Results from four independent experiments (untreated, *n* = 11; ATO, *n* = 10; IFNα, *n* = 15; and IFNα + ATO, *n* = 15). One-way ANOVA with multiple comparisons. The values shown are mean ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

sumoylation—by PML-NBs (Sahin et al., 2014; Seeler and Dejean, 2017). That *Jak2*^{V617F} HSCs exhibit high basal levels of PML and reactive oxygen species (Marty et al., 2013) may explain their higher sensitivity to NB biogenesis enforced by the IFNα+ATO combination. Our findings highlight an unexpected parallel with APL, where PML-NB reformation is required for eradication of the disease (Ablain et al., 2014; de Thé et al., 2017; Lehmann-Che et al., 2014). PML may thus represent a common

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

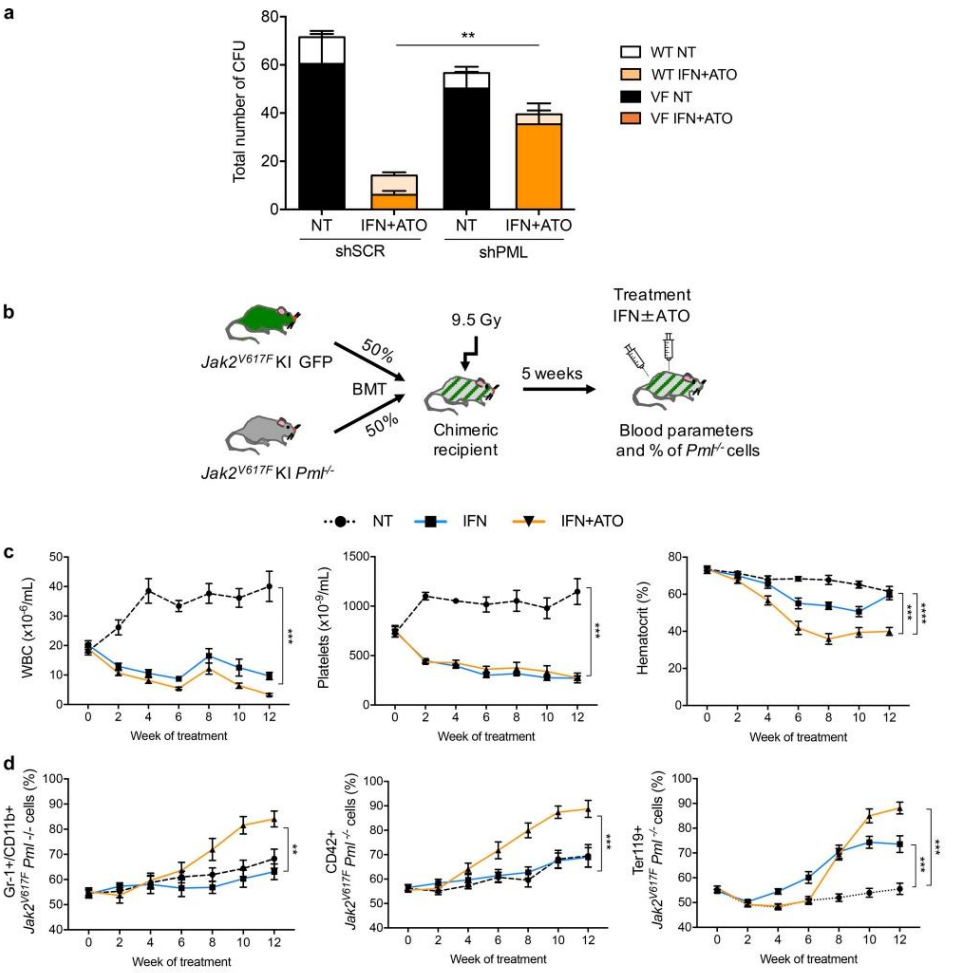


Figure 4. **PML drives IFNα+ATO response. (a)** Absolute numbers of *JAK2*^{WT} (WT) and *JAK2*^{V617F} (VF) erythroid colonies after 14 d of culture of shSCR–treated (PML expressing) or shPML-treated (PML down-regulated) CD34$^+$ cells from four JAK2^{V617F} MF patients untreated (NT) or treated with the combination of IFNα (200 IU/ml) and ATO (0.1 µM). Unpaired two-sided Student's *t* test. **(b)** Lethally irradiated mice were grafted with 50% BM cells from *Jak2*^{V617F} KI/*Ubi*GFP mice and 50% BM cells from *Jak2*^{V617F} KI *Pml*$^{-/-}$ mice. Mice were treated with IFNα alone or IFNα+ATO 4 wk after transplantation. **(c)** Blood parameters (WBCs, platelets, and hematocrit) every 2 wk during the treatment. $n = 5$ for each treatment; one-way ANOVA with multiple comparisons. **(d)** Percentage of *Pml*$^{-/-}$ Gr-1$^+$ cells (granulocytes), *Pml*$^{-/-}$ CD42$^+$ cells (platelets), and *Pml*$^{-/-}$ Ter119$^+$ cells (RBCs). $n = 5$ for each treatment; one-way ANOVA with multiple comparisons. Color code as in panel c. The values shown are mean ± SEM. **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001. BMT, BM transplantation.

effector pathway in cancer types where its gene is not rearranged. Clinically, our studies predict that ATO administration should greatly increase IFNα-driven responses in MPN patients. The IFNα+ATO combination had a favorable safety profile in another hematologic malignancy (Kchour et al., 2009), and availability of oral forms of ATO (Zhu et al., 2018) may allow outpatient therapy, paving the way toward eradication of JAK2^{V617F} MPN cells.

Methods and materials

Animal experiments

The conditional flexed *Jak2*^{V617F} KI mice were described (Hasan et al., 2013). To express the mutant *Jak2*, KI mice were crossed with *Vav*Cre transgenic (TG) mice (Croker et al., 2004). To easily evaluate the allele burden, we crossed *Jak2*^{V617F} KI/*Vav*Cre mice with *Ubi*GFP TG mice (Schaefer et al., 2001). To explore the PML

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404539/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

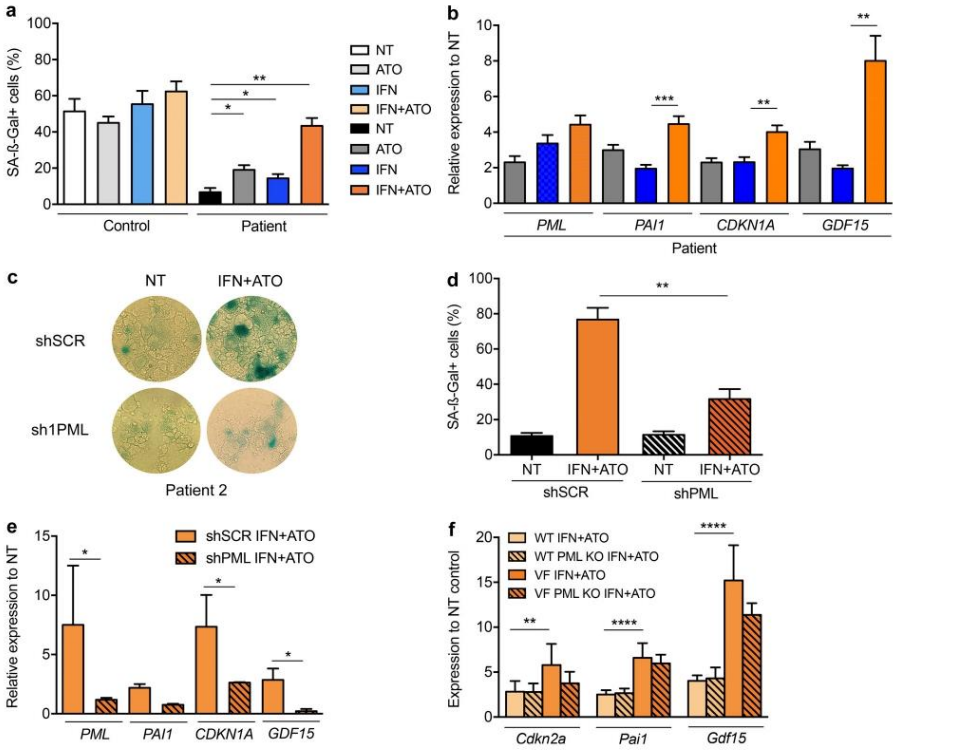


Figure 5. **IFNα+ATO drives PML-dependent senescence. (a)** Percentages of SA-β-Gal⁺ cells after CD34⁺ cells from three healthy donors' (control) and three *JAK2*^{V617F} MF patients' samples (patient) were treated with ATO (0.25 µM), IFNα (1,000 IU/ml), or both for 10 d. Unpaired two-sided Student's *t* test. **(b)** Relative expression to untreated control of senescence-associated genes *PML*, *PAI1*, *CDKN1A*, and *GDF15* of patient samples described in panel a. Color code as in panel a. Unpaired two-sided Student's *t* test. **(c)** SA-β-Gal staining of shSCR–treated (PML expressing) or shPML-treated (PML down-regulated) CD34⁺-derived cells from two MF patients after 10 d of megakaryocytic differentiation and untreated (NT) or treated with the combination IFNα (1,000 IU/ml) and ATO (0.25 µM). **(d)** Percentages of SA-β-Gal⁺ cells of shSCR–treated (PML-expressing) or shPML-treated (PML down-regulated) CD34⁺-derived cells from three MF patient samples after 10 d of megakaryocytic differentiation untreated or treated with the combination IFNα (1,000 IU/ml) and ATO (0.25 µM). **(e)** Relative expression of *PML*, *PAI1*, *CDKN1A*, and *GDF15* of samples described in panel d. Unpaired two-sided Student's *t* test. **(f)** Expression of *Cdkn2a*, *Pai1*, and *Gdf15* in mouse Lin⁻ BM cells derived from *Jak2*^{V617F} KI (VF) or littermate *Jak2*^{WT} (WT) mice deficient (hatched bars) or not (not hatched bars) in *Pml* treated in vitro with IFNα (1,000 IU/ml)+ATO (0.3 µM) for 24 h. The values shown are mean ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.

contribution to IFN response, we first generated C57BL/6 mice with a germinal deletion of Pml exon 3 by crossing *Pml*$^{f/f}$ mice (Amodeo et al., 2017) with *CMV*-Cre TG mice. Excision was confirmed by PCR and Western blot. These were crossed with C57BL/6 *Jak2*^{V617F} KI/*Vav*Cre mice or *Ubi*GFP TG mice. For primary or secondary BM transplantation, 3 × 10⁶ BM cells were engrafted into lethally irradiated (9.5 Gy) congenic recipient mice. To reproduce patient features, where normal hematopoiesis persists with the neoplastic clone (s), the preclinical mouse models were generated from normal recipient mice transplanted with a mixture of 40% BM cells collected from *Jak2*^{V617F} KI/*Vav*Cre/*Ubi*GFP mice, and 60% BM cells were collected from WT C57BL/6 mice. Murine IFNα (Miltenyi Biotech; 5 × 10⁷ IU/ml) was subcutaneously injected every day at doses of 3 × 10⁴ IU in 0.1 ml PBS/mouse (1.5 × 10⁶ IU/kg). ATO (As_2O_3, product number A1010; Sigma-Aldrich) was injected intraperitoneally at 5 mg/kg every 2 d.

Hemoglobin, mean corpuscular volume, hematocrit, RBC counts, platelet, and WBC counts were determined using an automated counter (MS9; Melet Schloesing Laboratoires) on blood collected from the retro-orbital plexus in EDTA tubes. BM cells were collected by flushing both femurs and tibias. Spleens were weighed, and single-cell suspensions were prepared. Relapse after therapy was evaluated based on the hematocrit (<50%), the allele burden (GFP⁺) in granulocytes (Gr-1⁺/CD11b⁺) or RBCs (Ter119⁺), and the spleen weight (<150 mg).

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404536/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

Flow cytometry

Flow cytometry of mouse blood, BM, and spleen was used to determine the *Jak2*^{V617F} allele burden as the percentage of GFP-positive cells in tissues (CANTO X, DIVA6 analyzer; Becton Dickinson). A small sample of blood was labeled with APC anti–TER-119 antibody (Ab; clone TER-119; BioLegend). The rest of the blood sample, after RBC lysis, was incubated with purified anti-CD16/32 Ab (clone 93; BioLegend) for 10 min at room temperature and then divided into two samples. The first one was labeled with APC-conjugated anti-CD42d Ab (clone 1C2; BioLegend) for platelets. The second one was labeled with PE/Cy7-conjugated anti–Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) Ab (clone RB6-8C5; BioLegend) and PerCP/Cyanine5.5-conjugated anti-CD11b Ab (clone M1/70; BioLegend) for granulocytes, PE-conjugated anti-CD45R/B220 Ab (clone RA3-6B2; BioLegend) for lymphocytes B, and APC-conjugated anti-CD3 Ab (clone 17A2; BioLegend) for lymphocytes T. For the BM sample, Lin$^-$ cells were enriched by immunomagnetic negative selection (IMag; BD Biosciences) and then sorted or assessed by flow cytometry using APC-conjugated lineage panel Abs (anti–TER-119 [clone TER-119], anti–Ly-6G/Ly-6C [Gr-1] Ab [clone RB6-8C5], anti-CD11b Ab [clone M1/70], anti-CD45R/B220 Ab [clone RA3-6B2], and anti-CD3 Ab [clone 17A2]). LK cells were analyzed from Lin$^-$ cells labeled with PerCP/Cyanine5.5–conjugated or PE-conjugated anti-CD117 Ab (c-Kit; clone 2B8; BioLegend). LSK cells were analyzed from Lin$^-$ cells labeled with PerCP/Cyanine5.5-conjugated or PE-conjugated anti-CD117 Ab (c-Kit; clone 2B8) and PE/Cy7-conjugated anti–Ly-6A/E Ab (Sca-1; clone D7; BioLegend). SLAM marker fractionated cells were analyzed from LSK cells labeled with APC/Cyanine7-conjugated anti-CD48 Ab (clone HM48-1; BioLegend) and Brilliant Violet 421–conjugated anti-CD150 Ab (clone TC15-12F12.2; BioLegend). After in vitro culture, viable cells were sorted after staining with SYTOX Blue Dead Cell Stain (S34857; Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). In human cell lines, the cell cycle distribution was measured via incorporation of BrdU (Phase-Flow; 370706; BioLegend) and DAPI (Thermo Fisher Scientific) labeling by flow cytometry on a FACS Canto II (Becton Dickinson) following the manufacturer's recommendations at day 1 after treatment with ATO, IFN, or both.

Immunofluorescence microscopy

Human cell lines, patient-derived cells, or mouse Lin$^-$ or LK cells were treated with ATO alone, IFN alone, or both and then washed with PBS, cytospined, fixed using 4% paraformaldehyde (Thermo Fisher Scientific) for 10 min, and permeabilized with 0.5% (human) or 0.2% (mouse) Triton X-100. Human cells were labeled with a murine monoclonal Ab detecting human PML and a secondary anti-mouse Ab conjugated to Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific; Lallemand-Breitenbach et al., 2001). Mouse monoclonal anti-mouse PML, clone 36.1–104 (MAB3738; Merck Millipore) was directly coupled to FITC fluorochrome or Alexa Fluor A594 for immunostaining. Slides were washed and then incubated in DAPI 1 µg/ml. After several washes, the slides were mounted in Vectashield H-1000 Mounting medium (Vector Laboratories, Inc.). For human samples, slides were kept at +4°C and analyzed under confocal microscope (LSM 800; Zeiss) under a 63× objective oil immersion. Z-stack images were processed with the image software ZEN (Zen 2 blue edition, 2011; Carl Zeiss Microscopy GmbH), and dots were counted and intensity measured on at least 20 cells spread over five to six fields with the image analysis software ImageJ (ImageJ2, Dec 2009). Mouse samples were imaged with a reversed confocal point-scanning microscope (SP8-Leica Microsystem) equipped with four lasers, 405, 488, 561, and 638 nm. An oil immersion, high numerical aperture (1.40) 63× objective was used for imaging. The scan protocol was preserved throughout all experiments. Two sequences were used to spectrally separate the two wavelengths, one for DAPI and the other for Alexa Fluor 594. The emission signal was collected on two HyD detectors for higher sensitivity. For the 594-nm signal, the "photon-counting" mode was used to remove any false numerical gain of signal. At least 20 cells per condition were analyzed using an ImageJ plug-in developed by Collège de France microscopy core facilities.

Cell lines and primary cells

The human megakaryoblastic UT-7 11oc1 cell line was a kind gift of Dr. Komatsu (Juntendo University Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan). These cells were lentivirally transduced either by JAK2^{WT}- or JAK2^{V617F}-expressing vectors as previously described (Besancenot et al., 2010). They were grown in DMEM-10% FBS-1% penicillin-streptomycin in the presence of erythropoietin (1 IU/ml). Human erythroleukemia cells (obtained from the American Type Culture Collection) were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and antibiotics (100 mg/ml penicillin-streptomycin mix; Thermo Fisher Scientific). Human CD34$^+$ cells were purified from peripheral blood mononuclear cells of PV/MF patients using the human CD34 MicroBead Kit from Miltenyi Biotec. Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were obtained at the French National Blood Service (French transfusion institution).

Human CD34$^+$ cells were cultured in StemSpan medium (StemCell Technologies, Inc.) in the presence of recombinant human cytokines (PeproTech France): thrombopoietin (20 ng/ml), stem cell factor (SCF; 100 ng/ml), and IL-3 (50 ng/ml) for 10 d for megakaryocytic differentiation. Cultured cells were maintained in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO_2. Cell lines were determined to be mycoplasma free. For human studies, we used IFNα-2a (Roferon-A; Roche or Merck Millipore) and ATO (As_2O_3, 01969, or A1010).

Mouse BM-derived Lin$^-$ cells were cultured in serum-free MSS medium (Iscove modified Dulbecco's medium with penicillin/streptomycin/glutamine, α-thioglycerol, bovine serum albumin, sonicated lipids, and insulin-transferrin; Amgen) supplemented with cytokines: murine SCF (50 ng/ml), murine IL-11 (100 ng/ml), and human FLt3 (50 ng/ml; Lui et al., 2014). Cultured cells were maintained in a humidified atmosphere at 37°C with 5% CO_2. Cells were treated with ATO (0.1 µM, 0.2 µM, or 0.3 µM), IFNα (200 IU/ml, 500 IU/ml, or 1,000 IU/ml; Miltenyi Biotech; 5 × 10^7 IU/ml), or both drugs.

CFU assays

Human clonogenic assays were performed by seeding in duplicates or triplicates 1,500–5,000 CD34$^+$ cells in MethoCult H4434 with cytokines (StemCell Technologies, Inc.) or MethoCult H4230

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

(StemCell Technologies, Inc.) with the following mixtures of cytokines: 25 ng/ml SCF (Biovitrum AB), 10 ng/ml IL-3 (Miltenyi Biotech), and 1 U/ml erythropoietin. Cultures were treated with ATO (0.1 µM), or IFNα (200–1,000 IU/ml), or both drugs. After 14 d of incubation, Burst-forming unit–erythroid, CFU-granulocyte, CFU-macrophage, and CFU-granulocyte-macrophage colonies were enumerated. Then, at least 40 colonies per condition were genotyped for *JAK2*^{V617F} with a TaqMan single-nucleotide polymorphism genotyping assay using the 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). We used forward (5′-AAGCTTTCTCACAAG CATTTGGTTT-3′) and reverse (5′-AGGCATTAGAAAGCCTGTAGT TTTACTT-3′) primers and allele-specific probes (WT: 5′-HEX-TGTGTCTGTGGAG-TAMRA-3′; V617F: 5′-6-FAM-TGTTTCTGT-GGAG-TAMRA-3′).

Mouse BM cells from *Jak2*^{V617F} KI or *Jak2*^{WT} littermate mice were used pure or mixed at 50% ratio and treated or not with IFNα 200 and 1,000 IU/ml (Miltenyi Biotech) with or without ATO 0.2 µM (As_2O_3, A1010). Cells were seeded at a density of 5 × 10^4/ml in semi-solid cultures (Methocult, M3434; Stem Cell Technologies) supplemented with thrombopoietin (10 ng/ml). Triplicate experiments were performed, twice with BM cells from *Jak2*^{WT} and *Jak2*^{V617F} GFP$^+$ and once with *Jak2*^{WT} GFP$^+$ and *Jak2*^{V617F}.

Viral transductions

CD34$^+$ cells derived from MPN patients were transduced by a pLVTHM-eGFP–shPML lentiviral vector (Ivanschitz et al., 2015; Niwa-Kawakita et al., 2017). Briefly, lentiviral vectors were packaged in 293T cells by transfecting pCMV-8.91 and pMD.G (Addgene) for 2 d. The supernatants containing the lentiviruses were concentrated with RetroX solution (Takara Bio Europe). Hematopoietic cells were then spinoculated for 90 min with the lentiviral supernatant and then cultured for 2 d. On the third day, the lentiviral supernatant was removed, and the percentage of transduced cells was evaluated by the percentage of GFP-positive cells in a FACS Canto II and then sorted in a FACS Aria III (Becton Dickinson).

Western blot

Cell pellets were lysed in 2× Laemmli buffer, sonicated on ice for 15 min, and denatured for 7 min at 95°C. Samples were separated by a 4–12% polyacrylamide gel. Proteins were transferred on a nitrocellulose membrane for 2 h. The membrane was blocked with 10% milk–Tris-buffered saline–Tween 0.1% and then incubated overnight at 4°C with mouse monoclonal anti-mouse PML, clone 36.1-104 (MAB3738). After several washes, the membrane was incubated with anti-mouse secondary Ab (Jackson ImmunoResearch) for 1 h at room temperature and washed, and protein expression was revealed using a luminescent Image Analyzer (ImageQuant LAS 4000; GE Healthcare Bio-Sciences).

Cell analysis

For proliferation assays, cells were seeded in triplicates at 3 × 10^5/ml in a 96-well plate in the presence of IFN, ATO, or both. Cells were counted at indicated time points with a TC20 counting apparatus (Bio-Rad), and cell viability was measured using trypan blue. Senescence-associated β-galactosidase (SA-β-Gal) staining was performed in vitro on cells at 10 d of treatment with a Senescence β-Galactosidase Staining Kit (9860; Cell Signaling) following the manufacturer's recommendations. The percentages of stained cells were counted in 20 fields in each condition using an optical microscope in >4,000 cells.

Quantitative PCR of gene transcripts

Total RNA was isolated from cell lines or cells derived from human primary CD34$^+$ cells after 10 d of culture. RNA was extracted using Trizol (Thermo Fisher Scientific). First-strand cDNA was synthesized using SuperScript III reverse transcription (Thermo Fisher Scientific). Quantitative RT-PCR was performed using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix on a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Predesigned TaqMan assays for *PML*, *CDKN1A*, *PAI1*, and *GDF15* genes were purchased from Applied Biosystems. *TBP* was used as an endogenous control to calibrate the amount of target mRNA. Mouse Lin$^-$ cells were cultured during 24 h, and then total RNA was extracted using Direct-zol RNA MicroPrep (Zymo Research) and cDNA was synthesized using SuperScript IV VILO Master Mix with the ezDNase Enzyme kit (Thermo Fisher Scientific). Quantitative RT-PCR was performed in an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System thermocycler using the TB Green Premix Ex Taq (Takara Bio Europe). mRNA was normalized by measuring HPRT mRNA levels. The following primers were used: *Cdkn2a* forward 5′-GCTCTGGCTTTCGTGAACAT-3′ and *Cdkn2a* reverse 5′-TACGTGAACGTTGCCCATCA-3′; *Pai1* forward 5′-TGGGTGGAAAGGCATACCAAA-3′ and *Pai1* reverse 5′-AAG TAGAGGGCATTCACCAGC-3′; *Gdf15* forward 5′-GAGCTACGG GGTCGCTTC-3′ and *Gdf15* reverse 5′-GGGACCCCAATCTCACCT-3′; and *Hprt* forward 5′-AAGACTTGCTCGAGATGTCATGAA-3′ and *Hprt* reverse 5′-ATCCAGCAGGTCCCTTGAACCTT-3′.

Study approval

Blood samples were obtained from Gustave Roussy (Villejuif, France) and Saint Louis Hospital (Paris, France), with agreement from the Comité de Protection des Personnes 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 (authorization #915663). Written informed consent forms were obtained in accordance with the Declaration of Helsinki.

Animal experiments were conducted in the Gustave Roussy animal facility and approved by the Gustave Roussy review board, authorization for the use of animals for scientific purposes protocol #2016–104 and project titled "Treatment and evolution of MPN."

Statistical analysis

In vivo data are presented as mean ± SEM and were analyzed with the Dunnett method as part of one-way ANOVA with multiple comparison tests (GraphPad Prism) or with the two-tailed Student's *t* test. In vitro data were analyzed using the Student's *t* test and two-way ANOVA for clonogenic assays. Error bars represent the mean ± SEM. In all figures, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001.

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

Online supplemental material

Fig. S1 compares the effects of IFN and ATO on cells expressing—or not expressing—$JAK2^{V617F}$. Fig. S2 depicts the MPN mouse model used in Fig. 3. Fig. S3 compares senescence induction in control and $JAK2^{V617F}$-expressing MPN cells.

Acknowledgments

We thank Maxime Annereau and Antoine Pinon from the Institut Gustave Roussy (IGR) Pharmacy Department for ATO preparation; Philippe Mailly from Collège de France for ImageJ plug-in development; Pr. Warren Alexander (Walter Elisa Hall Institute, Melbourne, Australia) for the *Vav*Cre mice; Paolo Salomoni and Pierluigi Nicotera (German Center for Neurodegenerative Diseases, Bonn, Germany) for providing C57BL/6 mice with a floxed *Pml* exon 3; Véronique Montcuquet (IRSL) for *CMV*-Cre mice; the staff of the animal facilities of Gustave Roussy directed by Patrick Gonin and the staff of the Platform of Imaging and Flow Cytometry Philippe Rameau, Cyril Catelain, and Tudor Manoliu; Yohan Courtin for technical assistance, Niclas Setterblad and the IRSL technological platforms for excellent technical help; and Christine Chomienne and the French Intergroup for Myeloproliferative Neoplasms for fruitful discussions. This manuscript was edited by Life Science Editors.

This work was supported by grants from the MPN Research Foundation on IFN initiative (to I. Plo and J.-L. Villeval), INCA (Institut National du Cancer) Plbio 2014 (to J.-L. Villeval and J.-J. Kiladjian), INCA Plbio 2018 (to I. Plo, J.-J. Kiladjian, and H. de Thé), and the European Research Council (PML-Therapy advanced grant to H. de Thé). Labex GR-Ex (to I. Plo and J.-J. Kiladjian) is funded by the program "Investissements d'avenir." T. Dagher was supported by PhD grants from Université Paris Sud Saclay-MESR (Ministère Enseignement Supérieur et de la Recherche). N. Maslah was supported by INSERM grant "poste d'accueil."

Author contributions: T. Dagher, N. Maslah, V. Edmond, B. Cassinat, M. Niwa-Kawakita, I. Plo, and J.-L. Villeval performed the experiments; W. Vainchenker, S. Giraudier, F. Pasquier, E. Verger, and J.-J. Kiladjian provided patient specimens; T. Dagher, N. Maslah, V. Edmond, B. Cassinat, W. Vainchenker, V. Lallemand-Breitenbach, I. Plo, J.-J. Kiladjian, J.-L. Villeval, and H. de Thé designed the experiments, interpreted data, and contributed to the writing of the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Disclosures: B. Cassinat reported a pending patent to WO2018134260. W. Vainchenker reported a patent to JAK2V617F licensed "Quiagen." V. Lallemand-Breitenbach reported a pending patent to WO2018134260. J. Kiladjian reported personal fees from AOP Orphan during the conduct of the study and personal fees from Novartis outside the submitted work. In addition, J. Kiladjian had a pending patent to WO2018134260 naming Hugues de Thé, Bruno Cassinat, Valérie Lallemand-Breitenbach, Isabelle Plo, Jean-Luc Villeval, and Jean-Jacques Kiladjian as inventors. H. de Thé reported personal fees from Vectorlab outside the submitted work; in addition, H. de Thé had a pending patent to WO2018134260. No other disclosures were reported.

Submitted: 18 June 2020
Revised: 31 July 2020
Accepted: 9 September 2020

References

Ablain, J., K. Rice, H. Soilihi, A. de Reynies, S. Minucci, and H. de Thé. 2014. Activation of a promyelocytic leukemia-tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nat. Med.* 20:167–174. https://doi.org/10.1038/nm.3441

Amodeo, V., D. A, J. Betts, S. Bartesaghi, Y. Zhang, A. Richard-Londt, M. Ellis, R. Roshani, M. Vouri, S. Galavotti, et al. 2017. A PML/Slit Axis Controls Physiological Cell Migration and Cancer Invasion in the CNS. *Cell Rep.* 20:411–426. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.047

Austin, R.J., J. Straube, C. Bruedigam, G. Pali, S. Jacquelin, T. Vu, J. Green, J. Gräsel, L. Lansink, L. Cooper, et al. 2020. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm hematopoietic stem cell populations. *Leukemia.* 34:1075–1089. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0638-y

Besancenot, R., R. Chaligné, C. Tonetti, F. Pasquier, C. Marty, Y. Lécluse, W. Vainchenker, S.N. Constantinescu, and S. Giraudier. 2010. A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. *PLoS Biol.* 8:e1000476. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000476

Croker, B.A., D. Metcalf, L. Robb, W. Wei, S. Mifsud, L. DiRago, L.A. Cluse, K.D. Sutherland, L. Hartley, E. Williams, et al. 2004. SOCS3 is a critical physiological negative regulator of G-CSF signaling and emergency granulopoiesis. *Immunity.* 20:153–165. https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00022-6

de Thé, H., P.P. Pandolfi, and Z. Chen. 2017. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell.* 32:552–560. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.10.002

Giorgi, C., K. Ito, H.K. Lin, C. Santangelo, M.R. Wieckowski, M. Lebiedzinska, A. Bononi, M. Bonora, J. Duszynski, R. Bernardi, et al. 2010. PML regulates apoptosis at endoplasmic reticulum by modulating calcium release. *Science.* 330:1247–1251. https://doi.org/10.1126/science.1189157

Gisslinger, H., C. Klade, P. Georgiev, D. Krochmalczyk, L. Gercheva-Kyuchukova, M. Egyed, V. Rossiev, P. Dulicek, A. Illes, H. Pylypenko, et al. PROUD-PV Study Group. 2020. Ropeginterferon alfa-2b versus standard therapy for polycythaemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. *Lancet Haematol.* 7:E196–E208. https://doi.org/10.1016/S2352-3026(19)30236-4

Hasan, S., C. Lacout, C. Marty, M. Cuingnet, E. Solary, W. Vainchenker, and J.L. Villeval. 2013. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNα. *Blood.* 122:1464–1477. https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-498956

Hsu, K.S., and H.Y. Kao. 2018. PML: Regulation and multifaceted function beyond tumor suppression. *Cell Biosci.* 8:5. https://doi.org/10.1186/s13578-018-0204-8

Ivanschitz, L., Y. Takahashi, F. Jollivet, O. Ayrault, M. Le Bras, and H. de Thé. 2015. PML IV/ARF interaction enhances p53 SUMO-1 conjugation, activation, and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 112:14278–14283. https://doi.org/10.1073/pnas.1507540112

Jeanne, M., V. Lallemand-Breitenbach, O. Ferhi, M. Koken, M. Le Bras, S. Duffort, L. Peres, C. Berthier, H. Soilihi, B. Raught, et al. 2010. PML/RARA oxidation and arsenic binding initiate the antileukemia response of As2O3. *Cancer Cell.* 18:88–98. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.06.003

Kchour, G., M. Tarhini, M.M. Kooshyar, H. El Hajj, E. Wattel, M. Mahmoudi, H. Hatoum, H. Rahimi, M. Maleki, H. Rafatpanah, et al. 2009. Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood.* 113:6528–6532. https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211821

Kiladjian, J.J., B. Cassinat, P. Turlure, N. Cambier, M. Roussel, S. Bellucci, M.L. Menot, G. Massonnet, J.L. Dutel, K. Ghomari, et al. 2006. High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon α-2a. *Blood.* 108:2037–2040. https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-009860

Kiladjian, J.J., B. Cassinat, S. Chevret, P. Turlure, N. Cambier, M. Roussel, S. Bellucci, B. Grandchamp, C. Chomienne, and P. Fenaux. 2008. Pegylated

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood.* 112:3065–3072. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143537

Kiladjian, J.J., S. Giraudier, and B. Cassinat. 2016. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. *Leukemia.* 30:776–781. https://doi.org/10.1038/leu.2015.326

Lallemand-Breitenbach, V., and H. de Thé. 2018. PML nuclear bodies: from architecture to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 52:154–161. https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.03.011

Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honoré, A. Doubeikovsky, E. Duprez, P.P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont, and H. de Thé. 2001. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.* 193:1361–1372. https://doi.org/10.1084/jem.193.12.1361

Lallemand-Breitenbach, V., M. Jeanne, S. Benhenda, R. Nasr, M. Lei, L. Peres, J. Zhou, J. Zhu, B. Raught, and H. de Thé. 2008. Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.* 10:547–555. https://doi.org/10.1038/ncb1717

Lehmann-Che, J., C. Bally, and H. de Thé. 2014. Resistance to therapy in acute promyelocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 371:1171–1172.

Lu, M., L. Xia, Y. Li, X. Wang, and R. Hoffman. 2014. The orally bioavailable MDM2 antagonist RG7112 and pegylated interferon α 2a target JAK2V617F-positive progenitor and stem cells. *Blood.* 124:771–779. https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-536854

Lui, W.C., Y.F. Chan, L.C. Chan, and R.K. Ng. 2014. Cytokine combinations on the potential for ex vivo expansion of murine hematopoietic stem cells. *Cytokine.* 68:127–132. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.04.008

Marty, C., C. Lacout, N. Droin, J.P. Le Couédic, V. Ribrag, E. Solary, W. Vainchenker, J.L. Villeval, and I. Plo. 2013. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia.* 27:2187–2195. https://doi.org/10.1038/leu.2013.102

Mascarenhas, J., M. Lu, H. Kosiorek, E. Virtgaym, L. Xia, L. Sandy, R. Mesa, B. Petersen, N. Farnoud, V. Najfeld, et al. 2019. Oral idasanutlin in patients with polycythemia vera. *Blood.* 134:525–533. https://doi.org/10.1182/blood.2018893545

Mullally, A., L. Poveromo, R.K. Schneider, F. Al-Shahrour, S.W. Lane, and B.L. Ebert. 2012. Distinct roles for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. *Blood.* 120:166–172. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-402396

Mullally, A., C. Bruedigam, L. Poveromo, F.H. Heidel, A. Purdon, T. Vu, R. Austin, D. Heckl, L.J. Breyfogle, C.P. Kuhn, et al. 2013. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-α in a murine model of polycythemia vera. *Blood.* 121:3692–3702. https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-432989

Niwa-Kawakita, M., O. Ferhi, H. Soilihi, M. Le Bras, V. Lallemand-Breitenbach, and H. de Thé. 2017. PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *J. Exp. Med.* 214:3197–3206. https://doi.org/10.1084/jem.20160301

Pasquier, F., X. Cabagnols, L. Secardin, I. Plo, and W. Vainchenker. 2014. Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 14(Suppl):S23–S35. https://doi.org/10.1016/j.clml.2014.06.014

Pearson, M., R. Carbone, C. Sebastiani, M. Cioce, M. Fagioli, S. Saito, Y. Higashimoto, E. Appella, S. Minucci, P.P. Pandolfi, and P.G. Pelicci. 2000. PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature.* 406:207–210. https://doi.org/10.1038/35018127

Quignon, F., F. De Bels, M. Koken, J. Feunteun, J.-C. Ameisen, and H. de Thé. 1998. PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat. Genet.* 20:259–265. https://doi.org/10.1038/3068

Sahin, U., O. Ferhi, M. Jeanne, S. Benhenda, C. Berthier, F. Jollivet, M. Niwa-Kawakita, O. Faklaris, N. Setterblad, H. de Thé, and V. Lallemand-Breitenbach. 2014. Oxidative stress-induced assembly of PML nuclear bodies controls sumoylation of partner proteins. *J. Cell Biol.* 204:931–945. https://doi.org/10.1083/jcb.201305148

Salomoni, P., and P.P. Pandolfi. 2002. The role of PML in tumor suppression. *Cell.* 108:165–170. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00626-8

Schaefer, B.C., M.L. Schaefer, J.W. Kappler, P. Marrack, and R.M. Kedl. 2001. Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo. *Cell. Immunol.* 214:110–122. https://doi.org/10.1006/cimm.2001.1895

Seeler, J.S., and A. Dejean. 2017. SUMO and the robustness of cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 17:184–197. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.143

Spivak, J.L. 2019. How I treat polycythemia vera. *Blood.* 134:341–352. https://doi.org/10.1182/blood.2018834044

Stadler, M., M.K. Chelbi-Alix, M.H.M. Koken, L. Venturini, C. Lee, A. Saïb, F. Quignon, L. Pelicano, M.-C. Guillemin, C. Schindler, and H. de Thé. 1995. Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene.* 11:2565–2573.

Takahashi, Y., V. Lallemand-Breitenbach, J. Zhu, and H. de Thé. 2004. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene.* 23:2819–2824. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207533

Vainchenker, W., and R. Kralovics. 2017. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 129:667–679. https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-695940

Verger, E., J. Soret-Dulphy, N. Maslah, L. Roy, J. Rey, Z. Ghrieb, R. Kralovics, H. Gisslinger, B. Grohmann-Izay, C. Klade, et al. 2018. Ropeginterferon alpha-2b targets JAK2V617F-positive polycythemia vera cells in vitro and in vivo. *Blood Cancer J.* 8:94. https://doi.org/10.1038/s41408-018-0133-0

Vernier, M., and G. Ferbeyre. 2014. Complete senescence: RB and PML share the task. *Cell Cycle.* 13:696. https://doi.org/10.4161/cc.28090

Vernier, M., V. Bourdeau, M.F. Gaumont-Leclerc, O. Moiseeva, V. Bégin, F. Saad, A.M. Mes-Masson, and G. Ferbeyre. 2011. Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* 25:41–50. https://doi.org/10.1101/gad.1975111

Zhang, X.W., X.J. Yan, Z.R. Zhou, F.F. Yang, Z.Y. Wu, H.B. Sun, W.X. Liang, A.X. Song, V. Lallemand-Breitenbach, M. Jeanne, et al. 2010. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science.* 328:240–243. https://doi.org/10.1126/science.1183424

Zhu, J., M.H.M. Koken, F. Quignon, M.K. Chelbi-Alix, L. Degos, Z.Y. Wang, Z. Chen, and H. de Thé. 1997. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:3978–3983. https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3978

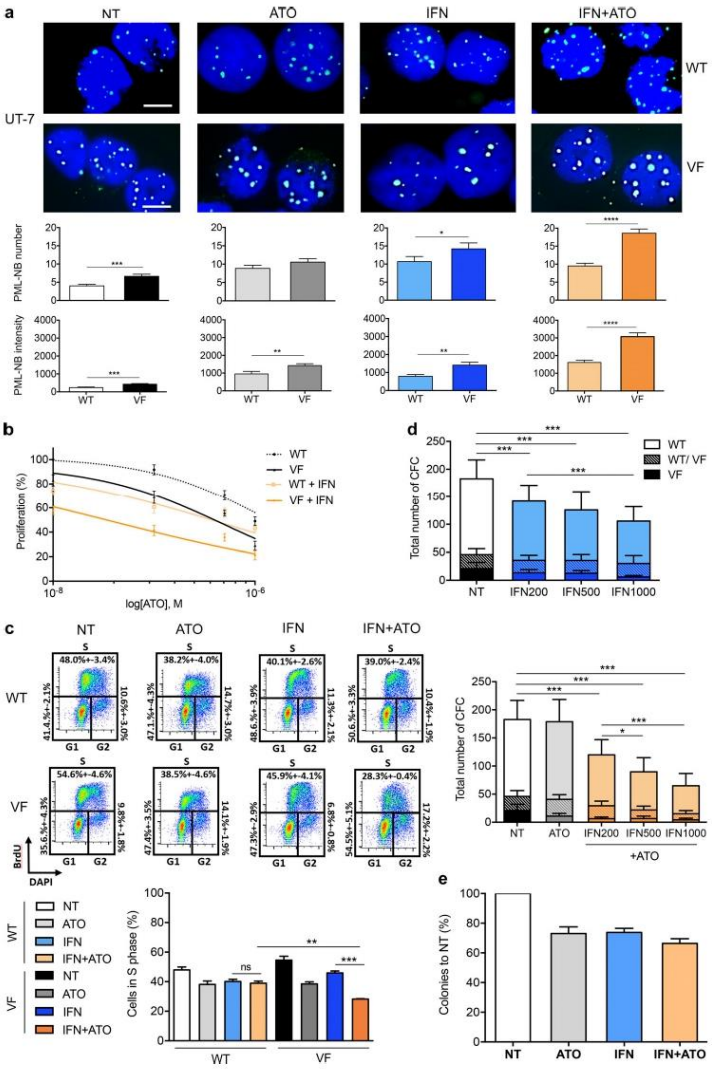
Zhu, H.H., Y.R. Liu, J.S. Jia, Y.Z. Qin, X.S. Zhao, and Y.Y. Lai. 2018. Oral arsenic and all-*trans* retinoic acid for high-risk acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 131:2987–2989. https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-834051

Zitvogel, L., L. Galluzzi, O. Kepp, M.J. Smyth, and G. Kroemer. 2015. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 15:405–414. https://doi.org/10.1038/nri3845

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

JEM

Supplemental material



Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

Figure S1. **Arsenic potently enhances NB formation and IFN-driven growth suppression in JAK2^{V617F}-expressing cells. (a)** Representative immunofluorescence images (upper panel) and quantification of PML-NB numbers and intensities per cell (lower panel) in JAK2^{WT} (WT) and JAK2^{V617F} (VF) UT-7 cells untreated (NT) or treated with ATO (0.5 µM) for 2 h, IFNα (1,000 IU/ml) for 24 h, or the combination of both drugs in these conditions. Three independent experiments with at least 20 cells analyzed per condition. Two-tailed unpaired Student's *t* test. Scale bars = 5 µm. **(b)** Proliferation of JAK2^{WT} (WT) or JAK2^{V617F} (VF) UT-7 cells after 72 h of treatment with increasing doses of ATO alone or combined with IFNα 200 IU/ml. Three independent experiments. **(c)** Top panels: example of cell cycle analysis (BrdU/DAPI staining) of either JAK2^{WT} (WT) or JAK2^{V617F} (VF) UT-7 cells 1 d after being untreated or treated with ATO (0.25 µM), IFNα (1,000 IU/ml), or the combination of both. Bottom plot: summary and statistical analysis of three independent experiments. **(d)** Absolute numbers of JAK2$^{WT/WT}$ (WT), JAK2$^{WT/V617F}$ (WT/VF), or JAK2$^{V617F/V617F}$ (VF) colonies counted after 14 d of culture of CD34$^+$ cells from seven PV patients. The effect of increasing doses of IFNα (200 IU/ml, 500 IU/ml, and 1,000 IU/ml) is shown on the upper panel, and the effect of increasing doses of IFNα (0 IU/ml, 200 IU/ml, 500 IU/ml, and 1,000 IU/ml) in combination with a constant dose of ATO (0.1 µM) is shown on the lower panel. Seven patient samples in duplicate cultures. Two-tailed unpaired Student's *t* test. **(e)** Percentages of erythroid colonies relative to untreated controls after 14 d of culture of CD34$^+$ cells from five healthy donors untreated or treated with ATO (0.1 µM), IFNα (200 IU/ml), or both drugs in triplicate cultures. Two-tailed unpaired Student's *t* test. The values shown are mean ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; ****P < 0.0001; ns, not significant; CFC, colony-forming cell.

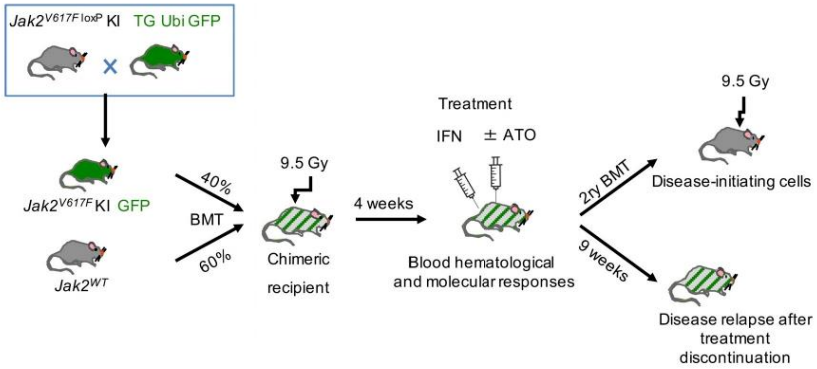


Figure S2. **Experimental design of the preclinical MPN mouse model.** Recipient mice were lethally irradiated and transplanted with 3 × 10^6 40:60 mix of *Jak2*^{V617F}/*Ubi*GFP and *Jak2*^{WT} BM cells. 4 wk after BM transplantation (BMT), mice were treated with ATO (5 mg/kg/2 d), IFNα (3 × 10^4 IU/d), or both for 8 wk. At completion of treatment, some mice were sacrificed, and their BM cells were used to assess disease-initiating cells in secondary transplantations, also with 3 × 10^6 BM cells; the remaining mice were kept alive to assess disease relapse around 9 wk without further treatment.

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

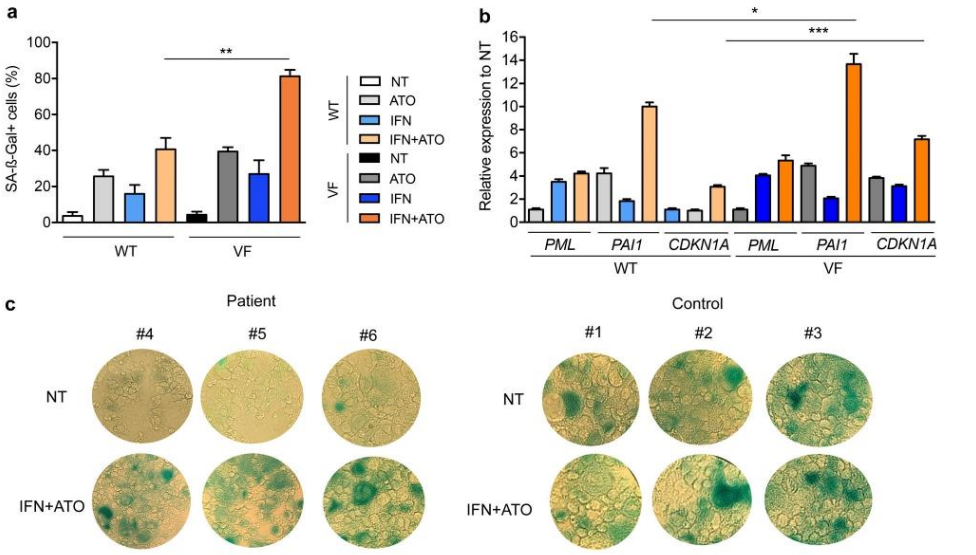


Figure S3. **IFN/ATO drives senescence more efficiently in the JAK2^{V617F} context. (a)** Percentages of JAK2^{WT} (WT) or JAK2^{V617F} (VF) UT-7 cells untreated (NT) or treated with ATO (0.25 µM), IFNα (1,000 IU/ml), or both drugs for 7 d stained positively for SA-β-Gal. **(b)** Relative expression to untreated control of the senescence-associated genes *PML*, *PAI1*, and *CDKN1A* in UT-7 cells. Color code as in panel a. Error bars represent mean ± SEM of three independent experiments; unpaired two-sided Student's *t* test. **(c)** SA-β-Gal staining assay of CD34$^+$-derived cells from three MF patients or three healthy controls after 10 d of megakaryocytic differentiation and untreated or treated with the combination of IFNα (1,000 IU/ml) and ATO (0.25 µM). The values shown are mean ± SEM. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001.

Downloaded from http://rupress.org/jem/article-pdf/218/2/e20201268/1404538/jem_20201268.pdf by guest on 19 October 2020

REFERENCES

1. Lorenz, E., Congdon, C. & Uphoff, D. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiology* **58**, 863–877 (1952).

2. Till, J. E. & McCULLOCH, E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–222 (1961).

3. Wilson, A. *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118–1129 (2008).

4. Shepherd, B. E., Guttorp, P., Lansdorp, P. M. & Abkowitz, J. L. Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Exp. Hematol.* **32**, 1040–1050 (2004).

5. Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E. & Dick, J. E. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* **10**, 120–136 (2012).

6. Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D. & Dick, J. E. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5320–5325 (1997).

7. Notta, F. *et al.* Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science* **351**, aab2116 (2016).

8. Benveniste, P. *et al.* Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* **6**, 48–58 (2010).

9. Hao, Q. L., Thiemann, F. T., Petersen, D., Smogorzewska, E. M. & Crooks, G. M. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. *Blood* **88**, 3306–3313 (1996).

10. Itoh, K. *et al.* Reproducible establishment of hemopoietic supportive stromal cell lines from murine bone marrow. *Exp. Hematol.* **17**, 145–153 (1989).

11. Bennaceur-Griscelli, A., Pondarré, C., Schiavon, V., Vainchenker, W. & Coulombel, L. Stromal cells retard the differentiation of CD34(+)CD38(low/neg) human primitive progenitors exposed to cytokines independent of their mitotic history. *Blood* **97**, 435–441 (2001).

12. Manz, M. G., Miyamoto, T., Akashi, K. & Weissman, I. L. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11872–11877 (2002).

13. Galy, A., Travis, M., Cen, D. & Chen, B. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* **3**, 459–473 (1995).

14. Doulatov, S. *et al.* Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat. Immunol.* **11**, 585–593 (2010).

15. Pina, C. *et al.* Inferring rules of lineage commitment in haematopoiesis. *Nat. Cell Biol.* **14**, 287–294 (2012).

16. Dykstra, B. *et al.* Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* **1**, 218–229 (2007).

17. Benz, C. *et al.* Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell* **10**, 273–283 (2012).

18. Sanjuan-Pla, A. *et al.* Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature* **502**, 232–236 (2013).

19. Pronk, C. J. H. *et al.* Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell Stem Cell* **1**, 428–442 (2007).

20. Paul, F. *et al.* Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell* **163**, 1663–1677 (2015).

21. Nestorowa, S. *et al.* A single-cell resolution map of mouse hematopoietic stem and progenitor cell differentiation. *Blood* **128**, e20-31 (2016).

22. Pietras, E. M. *et al.* Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell* **17**, 35–46 (2015).

23. Briddell, R. A., Brandt, J. E., Straneva, J. E., Srour, E. F. & Hoffman, R. Characterization of the human burst-forming unit-megakaryocyte. *Blood* **74**, 145–151 (1989).

24. Kirshenbaum, A. S., Akin, C., Goff, J. P. & Metcalfe, D. D. Thrombopoietin alone or in the presence of stem cell factor supports the growth of KIT(CD117)low/ MPL(CD110)+ human mast cells from hematopoietic progenitor cells. *Exp. Hematol.* **33**, 413–421 (2005).

25. Debili, N. *et al.* Expression of CD34 and platelet glycoproteins during human megakaryocytic differentiation. *Blood* **80**, 3022–3035 (1992).

26. Vinci, G. *et al.* Immunological study of in vitro maturation of human megakaryocytes. *Br. J. Haematol.* **56**, 589–605 (1984).

27. Bartley, T. D. *et al.* Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* **77**, 1117–1124 (1994).

28. de Sauvage, F. J. *et al.* Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* **369**, 533–538 (1994).

29. Kaushansky, K. *et al.* Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* **369**, 568–571 (1994).

30. Lok, S. *et al.* Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* **369**, 565–568 (1994).

31. Wendling, F. *et al.* cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. *Nature* **369**, 571–574 (1994).

32. Kimura, S., Roberts, A. W., Metcalf, D. & Alexander, W. S. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 1195–1200 (1998).

33. Fielder, P. J. *et al.* Human platelets as a model for the binding and degradation of thrombopoietin. *Blood* **89**, 2782–2788 (1997).

34. Kuter, D. J. & Rosenberg, R. D. The reciprocal relationship of thrombopoietin (c-Mpl ligand) to changes in the platelet mass during busulfan-induced thrombocytopenia in the rabbit. *Blood* **85**, 2720–2730 (1995).

35. McCarty, J. M., Sprugel, K. H., Fox, N. E., Sabath, D. E. & Kaushansky, K. Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* **86**, 3668–3675 (1995).

36. Miyakawa, Y., Drachman, J. G., Gallis, B., Kaushansky, A. & Kaushansky, K. A Structure-Function Analysis of Serine/Threonine Phosphorylation of the Thrombopoietin Receptor, c-Mpl. *J. Biol. Chem.* **275**, 32214–32219 (2000).

37. Miyakawa, Y. *et al.* Recombinant thrombopoietin induces rapid protein tyrosine phosphorylation of Janus kinase 2 and Shc in human blood platelets. *Blood* **86**, 23–27 (1995).

38. Miyakawa, Y. *et al.* Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood* **87**, 439–446 (1996).

39. van den Oudenrijn, S. *et al.* Mutations in the thrombopoietin receptor, Mpl, in children with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* **110**, 441–448 (2000).

40. Orkin, S. H., Shivdasani, R. A., Fujiwara, Y. & McDevitt, M. A. Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells* **16 Suppl 2**, 79–83 (1998).

41. Takahashi, S. *et al.* Role of GATA-1 in proliferation and differentiation of definitive erythroid and megakaryocytic cells in vivo. *Blood* **92**, 434–442 (1998).

42. Wechsler, J. *et al.* Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat. Genet.* **32**, 148–152 (2002).

43. Pope, N. J. & Bresnick, E. H. Differential coregulator requirements for function of the hematopoietic transcription factor GATA-1 at endogenous loci. *Nucleic Acids Res.* **38**, 2190–2200 (2010).

44. Wang, X. *et al.* Control of megakaryocyte-specific gene expression by GATA-1 and FOG-1: role of Ets transcription factors. *EMBO J.* **21**, 5225–5234 (2002).

45. Tsang, A. P. *et al.* FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell* **90**, 109–119 (1997).

46. Hong, W. *et al.* FOG-1 recruits the NuRD repressor complex to mediate transcriptional repression by GATA-1. *EMBO J.* **24**, 2367–2378 (2005).

47. Gao, Z. *et al.* FOG-1-mediated recruitment of NuRD is required for cell lineage re-enforcement during haematopoiesis. *EMBO J.* **29**, 457–468 (2010).

48. Lejon, S. *et al.* Insights into association of the NuRD complex with FOG-1 from the crystal structure of an RbAp48·FOG-1 complex. *J. Biol. Chem.* **286**, 1196–1203 (2011).

49. Bastian, L. S., Kwiatkowski, B. A., Breininger, J., Danner, S. & Roth, G. Regulation of the megakaryocytic glycoprotein IX promoter by the oncogenic Ets transcription factor Fli-1. *Blood* **93**, 2637–2644 (1999).

50. Hart, A. *et al.* Fli-1 is required for murine vascular and megakaryocytic development and is hemizygously deleted in patients with thrombocytopenia. *Immunity* **13**, 167–177 (2000).

51. Kawada, H. *et al.* Defective megakaryopoiesis and abnormal erythroid development in Fli-1 gene-targeted mice. *Int. J. Hematol.* **73**, 463–468 (2001).

52. Starck, J. *et al.* Inducible Fli-1 gene deletion in adult mice modifies several myeloid lineage commitment decisions and accelerates proliferation arrest and terminal erythrocytic differentiation. *Blood* **116**, 4795–4805 (2010).

53. Eisbacher, M. *et al.* Protein-protein interaction between Fli-1 and GATA-1 mediates synergistic expression of megakaryocyte-specific genes through cooperative DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3427–3441 (2003).

54. Fock, E., Yan, F., Pan, S. & Chong, B. H. NF-E2-mediated enhancement of megakaryocytic differentiation and platelet production in vitro and in vivo. *Exp. Hematol.* **36**, 78–92 (2008).

55. Shivdasani, R. A. *et al.* Transcription factor NF-E2 is required for platelet formation independent of the actions of thrombopoietin/MGDF in megakaryocyte development. *Cell* **81**, 695–704 (1995).

56. Ichikawa, M. *et al.* AML-1 is required for megakaryocytic maturation and lymphocytic differentiation, but not for maintenance of hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *Nat. Med.* **10**, 299–304 (2004).

57. Elagib, K. E. *et al.* RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood* **101**, 4333–4341 (2003).

58. Xu, G. *et al.* Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia* **20**, 1002–1008 (2006).

59. Huang, H. *et al.* Differentiation-dependent interactions between RUNX-1 and FLI-1 during megakaryocyte development. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 4103–4115 (2009).

60. Pencovich, N., Jaschek, R., Tanay, A. & Groner, Y. Dynamic combinatorial interactions of RUNX1 and cooperating partners regulates megakaryocytic differentiation in cell line models. *Blood* **117**, e1-14 (2011).

61. Edvardsson, L., Dykes, J. & Olofsson, T. Isolation and characterization of human myeloid progenitor populations--TpoR as discriminator between common myeloid and megakaryocyte/erythroid progenitors. *Exp. Hematol.* **34**, 599–609 (2006).

62. Mori, Y., Chen, J. Y., Pluvinage, J. V., Seita, J. & Weissman, I. L. Prospective isolation of human erythroid lineage-committed progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 9638–9643 (2015).

63. Li, J. *et al.* Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood* **124**, 3636–3645 (2014).

64. Hu, J. *et al.* Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. *Blood* **121**, 3246–3253 (2013).

65. Chen, K. *et al.* Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 17413–17418 (2009).

66. Flygare, J., Rayon Estrada, V., Shin, C., Gupta, S. & Lodish, H. F. HIF1alpha synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. *Blood* **117**, 3435–3444 (2011).

67. Nemeth, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* **306**, 2090–2093 (2004).

68. Nicolas, G. *et al.* The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J. Clin. Invest.* **110**, 1037–1044 (2002).

69. Kautz, L. *et al.* Identification of erythroferrone as an erythroid regulator of iron metabolism. *Nat. Genet.* **46**, 678–684 (2014).

70. Kautz, L. *et al.* Erythroferrone contributes to hepcidin suppression and iron overload in a mouse model of β-thalassemia. *Blood* **126**, 2031–2037 (2015).

71. Singbrant, S. *et al.* Erythropoietin couples erythropoiesis, B-lymphopoiesis, and bone homeostasis within the bone marrow microenvironment. *Blood* **117**, 5631–5642 (2011).

72. Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R. & Lodish, H. F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* **83**, 59–67 (1995).

73. Malik, J., Kim, A. R., Tyre, K. A., Cherukuri, A. R. & Palis, J. Erythropoietin critically regulates the terminal maturation of murine and human primitive erythroblasts. *Haematologica* **98**, 1778–1787 (2013).

74. Huang, L. J., Constantinescu, S. N. & Lodish, H. F. The N-Terminal Domain of Janus Kinase 2 Is Required for Golgi Processing and Cell Surface Expression of Erythropoietin Receptor. *Molecular Cell* **8**, 1327–1338 (2001).

75. Narhi, L. O., Aoki, K. H., Philo, J. S. & Arakawa, T. Changes in conformation and stability upon formation of complexes of erythropoietin (EPO) and soluble EPO receptor. *J. Protein Chem.* **16**, 213–225 (1997).

76. Philo, J. S., Aoki, K. H., Arakawa, T., Narhi, L. O. & Wen, J. Dimerization of the extracellular domain of the erythropoietin (EPO) receptor by EPO: one high-affinity and one low-affinity interaction. *Biochemistry* **35**, 1681–1691 (1996).

77. Syed, R. S. *et al.* Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**, 511–516 (1998).

78. Remy, I., Wilson, I. A. & Michnick, S. W. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990–993 (1999).

79. Starr, R. *et al.* A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917–921 (1997).

80. Naka, T. *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924–929 (1997).

81. Endo, T. A. *et al.* A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921–924 (1997).

82. Irie-Sasaki, J. *et al.* CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature* **409**, 349–354 (2001).

83. Minoo, P., Zadeh, M. M., Rottapel, R., Lebrun, J.-J. & Ali, S. A novel SHP-1/Grb2-dependent mechanism of negative regulation of cytokine-receptor signaling: contribution of SHP-1 C-terminal tyrosines in cytokine signaling. *Blood* **103**, 1398–1407 (2004).

84. Wilmes, S. *et al.* Mechanism of homodimeric cytokine receptor activation and dysregulation by oncogenic mutations. *Science* **367**, 643–652 (2020).

85. Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).

86. Wu, H., Klingmüller, U., Besmer, P. & Lodish, H. F. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature* **377**, 242–246 (1995).

87. Nocka, K. *et al.* Expression of c-kit gene products in known cellular targets of W mutations in normal and W mutant mice--evidence for an impaired c-kit kinase in mutant mice. *Genes Dev.* **3**, 816–826 (1989).

88. Dussiot, M. *et al.* An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β-thalassemia. *Nat. Med.* **20**, 398–407 (2014).

89. Suragani, R. N. V. S. *et al.* Transforming growth factor-β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. *Nat. Med.* **20**, 408–414 (2014).

90. Xu, J. *et al.* Combinatorial assembly of developmental stage-specific enhancers controls gene expression programs during human erythropoiesis. *Dev. Cell* **23**, 796–811 (2012).

91. Sankaran, V. G. *et al.* Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *J. Clin. Invest.* **122**, 2439–2443 (2012).

92. Ulirsch, J. C. *et al.* Altered chromatin occupancy of master regulators underlies evolutionary divergence in the transcriptional landscape of erythroid differentiation. *PLoS Genet.* **10**, e1004890 (2014).

93. Dogan, N. *et al.* Occupancy by key transcription factors is a more accurate predictor of enhancer activity than histone modifications or chromatin accessibility. *Epigenetics Chromatin* **8**, 16 (2015).

94. Sankaran, V. G. *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* **322**, 1839–1842 (2008).

95. Anderson, L. A. & McMullin, M. F. Epidemiology of MPN: What Do We Know? *Curr Hematol Malig Rep* **9**, 340–349 (2014).

96. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**, 2391–2405 (2016).

97. Osler, W. Chronic Cyanotic Polycythaemia with Enlarged Spleen. *Br Med J* **1**, 121–122 (1904).

98. Dameshek, W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* **6**, 372–375 (1951).

99. Prchal, J. F. & Axelrad, A. A. Letter: Bone-marrow responses in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **290**, 1382 (1974).

100. Wasserman, L. R. Polycythemia Vera Study Group: a historical perspective. *Semin. Hematol.* **23**, 183–187 (1986).

101. James, C. *et al.* A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).

102. Baxter, E. J. *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365**, 1054–1061 (2005).

103. Levine, R. L. *et al.* Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7**, 387–397 (2005).

104. Kralovics, R. *et al.* A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N. Engl. J. Med.* **352**, 1779–1790 (2005).

105. Titmarsh, G. J. *et al.* How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Hematol.* **89**, 581–587 (2014).

106. Johansson, P. Epidemiology of the myeloproliferative disorders polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin. Thromb. Hemost.* **32**, 171–173 (2006).

107. Marchioli, R. *et al.* Vascular and neoplastic risk in a large cohort of patients with polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2224–2232 (2005).

108. Epstein, E. & Goedel, A. Hämorrhagische Thrombocythämie bei vasculärer Schrumpfmilz. *Virchows Arch. path Anat.* **292**, 233–248 (1934).

109. Gunz, F. W. Hemorrhagic thrombocythemia: a critical review. *Blood* **15**, 706–723 (1960).

110. Girodon, F. *et al.* Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocythemia related to new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica* **94**, 865–869 (2009).

111. Randi, M. L. *et al.* Features of essential thrombocythaemia in childhood: a study of five children. *Br. J. Haematol.* **108**, 86–89 (2000).

112. Chaiter, Y., Brenner, B., Aghai, E. & Tatarsky, I. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leuk. Lymphoma* **7**, 251–255 (1992).

113. Srour, S. A. *et al.* Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br. J. Haematol.* **174**, 382–396 (2016).

114. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).

115. Tefferi, A. *et al.* Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* **124**, 2507–2513; quiz 2615 (2014).

116. Carobbio, A. *et al.* Risk factors for arterial and venous thrombosis in WHO-defined essential thrombocythemia: an international study of 891 patients. *Blood* **117**, 5857–5859 (2011).

117. Barbui, T. *et al.* Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* **32**, 1057–1069 (2018).

118. Marchioli, R. *et al.* Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **368**, 22–33 (2013).

119. Carobbio, A. *et al.* Leukocytosis is a risk factor for thrombosis in essential thrombocythemia: interaction with treatment, standard risk factors, and Jak2 mutation status. *Blood* **109**, 2310–2313 (2007).

120. Barbui, T., Carobbio, A., Rambaldi, A. & Finazzi, G. Perspectives on thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: is leukocytosis a causative factor? *Blood* **114**, 759–763 (2009).

121. Vannucchi, A. M. *et al.* Prospective identification of high-risk polycythemia vera patients based on JAK2(V617F) allele burden. *Leukemia* **21**, 1952–1959 (2007).

122. Rotunno, G. *et al.* Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* **123**, 1552–1555 (2014).

123. Di Nisio, M. *et al.* The haematocrit and platelet target in polycythemia vera. *Br. J. Haematol.* **136**, 249–259 (2007).

124. Cerquozzi, S. & Tefferi, A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors. *Blood Cancer J* **5**, e366 (2015).

125. Passamonti, F. *et al.* A dynamic prognostic model to predict survival in post-polycythemia vera myelofibrosis. *Blood* **111**, 3383–3387 (2008).

126. Passamonti, F. *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* **24**, 1574–1579 (2010).

127. Barbui, T. *et al.* Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3179–3184 (2011).

128. Tefferi, A. *et al.* Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* **27**, 1874–1881 (2013).

129. Parganas, E. *et al.* Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* **93**, 385–395 (1998).

130. Neubauer, H. *et al.* Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**, 397–409 (1998).

131. Kerenyi, M. A. *et al.* Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1. *Blood* **112**, 3878–3888 (2008).

132. Rouyez, M. C., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I. & Porteu, F. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4991–5000 (1997).

133. Witthuhn, B. A. *et al.* JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell* **74**, 227–236 (1993).

134. Drachman, J. G., Millett, K. M. & Kaushansky, K. Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J. Biol. Chem.* **274**, 13480–13484 (1999).

135. Touw, I. P. & van de Geijn, G.-J. M. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front. Biosci.* **12**, 800–815 (2007).

136. Royer, Y., Staerk, J., Costuleanu, M., Courtoy, P. J. & Constantinescu, S. N. Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J. Biol. Chem.* **280**, 27251–27261 (2005).

137. Shimoda, K. *et al.* Jak1 plays an essential role for receptor phosphorylation and Stat activation in response to granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **90**, 597–604 (1997).

138. Sattler, M. *et al.* The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp. Hematol.* **23**, 1040–1048 (1995).

139. Drachman, J. G. & Kaushansky, K. Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 2350–2355 (1997).

140. Constantinescu, null, Ghaffari, null & Lodish, null. The Erythropoietin Receptor: Structure, Activation and Intracellular Signal Transduction. *Trends Endocrinol. Metab.* **10**, 18–23 (1999).

141. van de Geijn, G.-J. M., Gits, J., Aarts, L. H. J., Heijmans-Antonissen, C. & Touw, I. P. G-CSF receptor truncations found in SCN/AML relieve SOCS3-controlled inhibition of STAT5 but leave suppression of STAT3 intact. *Blood* **104**, 667–674 (2004).

142. Watowich, S. S. *et al.* Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 91–128 (1996).

143. Lu, X. *et al.* Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 18962–18967 (2005).

144. Dusa, A., Mouton, C., Pecquet, C., Herman, M. & Constantinescu, S. N. JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors. *PLoS ONE* **5**, e11157 (2010).

145. Hammarén, H. M. *et al.* ATP binding to the pseudokinase domain of JAK2 is critical for pathogenic activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**, 4642–4647 (2015).

146. Bandaranayake, R. M. *et al.* Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 754–759 (2012).

147. Zhao, L. *et al.* A JAK2 interdomain linker relays Epo receptor engagement signals to kinase activation. *J. Biol. Chem.* **284**, 26988–26998 (2009).

148. Scott, L. M. *et al.* JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 459–468 (2007).

149. Kralovics, R., Guan, Y. & Prchal, J. T. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp. Hematol.* **30**, 229–236 (2002).

150. Beer, P. A. *et al.* Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. *Blood* **115**, 2891–2900 (2010).

151. Tefferi, A. *et al.* The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera. *Cancer* **106**, 631–635 (2006).

152. Vannucchi, A. M. *et al.* Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia. *Blood* **110**, 840–846 (2007).

153. Tiedt, R. *et al.* Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* **111**, 3931–3940 (2008).

154. Chen, E. *et al.* Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. *Cancer Cell* **18**, 524–535 (2010).

155. Huang, Z. *et al.* STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *J. Clin. Invest.* **117**, 3890–3899 (2007).

156. Duek, A. *et al.* Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. *Blood* **123**, 3943–3950 (2014).

157. Anand, S. *et al.* Increased basal intracellular signaling patterns do not correlate with JAK2 genotype in human myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 1610–1621 (2011).

158. Teofili, L. *et al.* Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation. *Blood* **110**, 354–359 (2007).

159. Jones, A. V. *et al.* JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat. Genet.* **41**, 446–449 (2009).

160. Pardanani, A., Fridley, B. L., Lasho, T. L., Gilliland, D. G. & Tefferi, A. Host genetic variation contributes to phenotypic diversity in myeloproliferative disorders. *Blood* **111**, 2785–2789 (2008).

161. Tapper, W. *et al.* Genetic variation at MECOM, TERT, JAK2 and HBS1L-MYB predisposes to myeloproliferative neoplasms. *Nat Commun* **6**, 6691 (2015).

162. Stein, B. L. *et al.* Sex differences in the JAK2 V617F allele burden in chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* **95**, 1090–1097 (2010).

163. Godfrey, A. L. *et al.* Clonal analyses reveal associations of JAK2V617F homozygosity with hematologic features, age and gender in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Haematologica* **98**, 718–721 (2013).

164. Baksh, S. & Michalak, M. Expression of calreticulin in Escherichia coli and identification of its Ca2+ binding domains. *J. Biol. Chem.* **266**, 21458–21465 (1991).

165. de Bruyn, M., Wiersma, V. R., Helfrich, W., Eggleton, P. & Bremer, E. The ever-expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity. *Front Oncol* **5**, 35 (2015).

166. Liu, P. *et al.* Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells. *Mol. Cell* **77**, 748-760.e9 (2020).

167. Klampfl, T. *et al.* Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379–2390 (2013).

168. Nangalia, J. *et al.* Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391–2405 (2013).

169. Rumi, E. *et al.* JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* **123**, 1544–1551 (2014).

170. Chi, J. *et al.* Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia* **28**, 1152–1154 (2014).

171. Rampal, R. *et al.* Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* **123**, e123-133 (2014).

172. Araki, M. *et al.* Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127**, 1307–1316 (2016).

173. Chachoua, I. *et al.* Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* **127**, 1325–1335 (2016).

174. Elf, S. *et al.* Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov* **6**, 368–381 (2016).

175. Marty, C. *et al.* Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* **127**, 1317–1324 (2016).

176. Pardanani, A. D. *et al.* MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* **108**, 3472–3476 (2006).

177. Pikman, Y. *et al.* MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* **3**, e270 (2006).

178. Cabagnols, X. *et al.* Presence of atypical thrombopoietin receptor (MPL) mutations in triple-negative essential thrombocythemia patients. *Blood* **127**, 333–342 (2016).

179. Feenstra, J. D. M. *et al.* Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127**, 325–332 (2016).

180. Mullally, A. *et al.* Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. *Cancer Cell* **17**, 584–596 (2010).

181. Hasan, S. *et al.* JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFNα. *Blood* **122**, 1464–1477 (2013).

182. Li, J. *et al.* JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood* **116**, 1528–1538 (2010).

183. Grisouard, J. *et al.* JAK2 exon 12 mutant mice display isolated erythrocytosis and changes in iron metabolism favoring increased erythropoiesis. *Blood* **128**, 839–851 (2016).

184. Sangkhae, V., Etheridge, S. L., Kaushansky, K. & Hitchcock, I. S. The thrombopoietin receptor, MPL, is critical for development of a JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. *Blood* **124**, 3956–3963 (2014).

185. Walz, C. *et al.* Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. *Blood* **119**, 3550–3560 (2012).

186. Grisouard, J. *et al.* Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. *Blood* **125**, 2131–2140 (2015).

187. Broséus, J., Park, J.-H., Carillo, S., Hermouet, S. & Girodon, F. Presence of calreticulin mutations in JAK2-negative polycythemia vera. *Blood* **124**, 3964–3966 (2014).

188. Passamonti, F. *et al.* Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. *Blood* **117**, 2813–2816 (2011).

189. Borowczyk, M. *et al.* The JAK2 V617F mutational status and allele burden may be related with the risk of venous thromboembolic events in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Thromb. Res.* **135**, 272–280 (2015).

190. Alvarez-Larrán, A. *et al.* JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am. J. Hematol.* **89**, 517–523 (2014).

191. Rotunno, G. *et al.* Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group. *Am. J. Hematol.* **91**, 681–686 (2016).

192. Smalberg, J. H. *et al.* Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* **120**, 4921–4928 (2012).

193. Stein, B. L. *et al.* Age-related differences in disease characteristics and clinical outcomes in polycythemia vera. *Leuk. Lymphoma* **54**, 1989–1995 (2013).

194. Iurlo, A. *et al.* Molecular analyses in the diagnosis of myeloproliferative neoplasm-related splanchnic vein thrombosis. *Ann. Hematol.* **94**, 881–882 (2015).

195. Rotunno, G. *et al.* Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* **123**, 1552–1555 (2014).

196. Barbui, T. *et al.* Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* **120**, 5128–5133; quiz 5252 (2012).

197. Finazzi, G. *et al.* Calreticulin mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocythemia. *Blood* **124**, 2611–2612 (2014).

198. Rumi, E. *et al.* Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. *Blood* **124**, 1062–1069 (2014).

199. Pietra, D. *et al.* Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **30**, 431–438 (2016).

200. Kourie, H. R., Ameye, L., Paesmans, M. & Bron, D. Improved Survival of Calreticulin-Mutated Patients Compared With Janus Kinase 2 in Primary Myelofibrosis: A Meta-Analysis. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* **16**, 264–268 (2016).

201. Grand, F. H. *et al.* Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**, 6182–6192 (2009).

202. Brecqueville, M. *et al.* Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes Chromosomes Cancer* **51**, 743–755 (2012).

203. Delhommeau, F. *et al.* Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N. Engl. J. Med.* **360**, 2289–2301 (2009).

204. Stegelmann, F. *et al.* DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **25**, 1217–1219 (2011).

205. Green, A. & Beer, P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **362**, 369–370 (2010).

206. Carbuccia, N. *et al.* Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **23**, 2183–2186 (2009).

207. Ernst, T. *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet.* **42**, 722–726 (2010).

208. Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1384–1395 (2011).

209. Graubert, T. A. *et al.* Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. *Nat. Genet.* **44**, 53–57 (2011).

210. Yoshida, K. *et al.* Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature* **478**, 64–69 (2011).

211. Ortmann, C. A. *et al.* Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **372**, 601–612 (2015).

212. Tefferi, A. *et al.* Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood Adv* **1**, 21–30 (2016).

213. Luque Paz, D. L. *et al.* Positive impact of molecular analysis on prognostic scores in essential thrombocythemia: a single center prospective cohort experience. *Haematologica* **104**, e134–e137 (2019).

214. Vannucchi, A. M. *et al.* Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* **27**, 1861–1869 (2013).

215. Guglielmelli, P. *et al.* The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* **28**, 1804–1810 (2014).

216. Lundberg, P. *et al.* Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **123**, 2220–2228 (2014).

217. Tefferi, A. *et al.* CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. *Leukemia* **28**, 1494–1500 (2014).

218. Guglielmelli, P. *et al.* MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* **36**, 310–318 (2018).

219. Tefferi, A. *et al.* GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia* **32**, 1631–1642 (2018).

220. Grinfeld, J. *et al.* Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **379**, 1416–1430 (2018).

221. Kapralova, K. *et al.* Cooperation of germ line JAK2 mutations E846D and R1063H in hereditary erythrocytosis with megakaryocytic atypia. *Blood* **128**, 1418–1423 (2016).

222. Grünebach, F., Bross-Bach, U., Kanz, L. & Brossart, P. Detection of a new JAK2 D620E mutation in addition to V617F in a patient with polycythemia vera. *Leukemia* **20**, 2210–2211 (2006).

223. Schnittger, S. *et al.* Report on two novel nucleotide exchanges in the JAK2 pseudokinase domain: D620E and E627E. *Leukemia* **20**, 2195–2197 (2006).

224. Perkins, J., Israuels, M. C. & Wilkinson, J. F. POLYCYTHAEMIA VERA: CLINICAL STUDIES ON A SERIES OF 127 PATIENTS MANAGED WITHOUT RADIATION THERAPY. *Q. J. Med.* **33**, 499–518 (1964).

225. Clarke, R. J., Mayo, G., Price, P. & FitzGerald, G. A. Suppression of thromboxane A2 but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1137–1141 (1991).

226. Van Der Ouderaa, F. J., Buytenhek, M., Nugteren, D. H. & Van Dorp, D. A. Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthetase with acetylsalicylic acid. *Eur. J. Biochem.* **109**, 1–8 (1980).

227. Landolfi, R. *et al.* Increased thromboxane biosynthesis in patients with polycythemia vera: evidence for aspirin-suppressible platelet activation in vivo. *Blood* **80**, 1965–1971 (1992).

228. Landolfi, R. *et al.* Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **350**, 114–124 (2004).

229. Jensen, M. K., de Nully Brown, P., Nielsen, O. J. & Hasselbalch, H. C. Incidence, clinical features and outcome of essential thrombocythaemia in a well defined geographical area. *Eur. J. Haematol.* **65**, 132–139 (2000).

230. Ahluwalia, M., Donovan, H., Singh, N., Butcher, L. & Erusalimsky, J. D. Anagrelide represses GATA-1 and FOG-1 expression without interfering with thrombopoietin receptor signal transduction. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 2252–2261 (2010).

231. Harrison, C. N. *et al.* Hydroxyurea Compared with Anagrelide in High-Risk Essential Thrombocythemia. *New England Journal of Medicine* **353**, 33–45 (2005).

232. Najean, Y. & Rain, J. D. Treatment of polycythemia vera: the use of hydroxyurea and pipobroman in 292 patients under the age of 65 years. *Blood* **90**, 3370–3377 (1997).

233. Fruchtman, S. M. *et al.* From efficacy to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. *Semin. Hematol.* **34**, 17–23 (1997).

234. Krakoff, I. H., Brown, N. C. & Reichard, P. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* **28**, 1559–1565 (1968).

235. Cortelazzo, S. *et al.* Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. *New England Journal of Medicine* **332**, 1132–1137 (1995).

236. Alvarez-Larrán, A. *et al.* Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood* **119**, 1363–1369 (2012).

237. Kiladjian, J.-J., Chevret, S., Dosquet, C., Chomienne, C. & Rain, J.-D. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea and pipobroman: final results of a randomized trial initiated in 1980. *J. Clin. Oncol.* **29**, 3907–3913 (2011).

238. Birgegård, G. *et al.* Leukemic transformation and second cancers in 3649 patients with high-risk essential thrombocythemia in the EXELS study. *Leuk. Res.* **74**, 105–109 (2018).

239. Verma, D. S. *et al.* Human leukocyte interferon preparation blocks granulopoietic differentiation. *Blood* **54**, 1423–1427 (1979).

240. Williams, C. K., Svet-Moldavskaya, I., Vilcek, J., Ohnuma, T. & Holland, J. F. Inhibitory effects of human leukocyte and fibroblasts interferons on normal and chronic myelogenous leukemic granulocytic progenitor cells. *Oncology* **38**, 356–360 (1981).

241. Talpaz, M., McCredie, K. B., Mavligit, G. M. & Gutterman, J. U. Leukocyte interferon-induced myeloid cytoreduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **62**, 689–692 (1983).

242. Subramaniam, P. S., Cruz, P. E., Hobeika, A. C. & Johnson, H. M. Type I interferon induction of the cdk-inhibitor p21(WAF1) is accompanied by ordered G1 arrest, differentiation and apoptosis of the Daudi B-cell line. *Oncogene* **16**, 1885–1890 (1998).

243. Selleri, C. *et al.* Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon-alpha in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **89**, 957–964 (1997).

244. Der, S. D., Zhou, A., Williams, B. R. G. & Silverman, R. H. Identification of genes differentially regulated by interferon α, β, or γ using oligonucleotide arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 15623–15628 (1998).

245. Molldrem, J. J. *et al.* Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nature Medicine* **6**, 1018–1023 (2000).

246. Sacchi, S. *et al.* Immune-mediated and unusual complications during interferon alfa therapy in chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **13**, 2401–2407 (1995).

247. Paquette, R. L. *et al.* Interferon-α induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo. *Leukemia* **16**, 1484–1489 (2002).

248. Oka, T. *et al.* Evidence for specific immune response against P210 BCR-ABL in long-term remission CML patients treated with interferon. *Leukemia* **12**, 155–163 (1998).

249. Pane, F. *et al.* BCR/ABL mRNA and the P210(BCR/ABL) protein are downmodulated by interferon-α in chronic myeloid leukemia patients. *Blood* **94**, 2200–2207 (1999).

250. Silver, R. T. A new treatment for polycythemia vera: recombinant interferon alfa. *Blood* **76**, 664–665 (1990).

251. Kiladjian, J.-J., Chomienne, C. & Fenaux, P. Interferon-α therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **22**, 1990–1998 (2008).

252. Kiladjian, J.-J. *et al.* High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a. *Blood* **108**, 2037–2040 (2006).

253. Kiladjian, J.-J. *et al.* Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* **112**, 3065–3072 (2008).

254. Hino, M. *et al.* Possible selective effects of Interferon α-2b on a malignant clone in a case of polycythemia vera. *Ann Hematol* **66**, 161–162 (1993).

255. Liu, E. *et al.* Discrimination of polycythemias and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood* **101**, 3294–3301 (2003).

256. Massaro, P. *et al.* Polycythemia vera treated with recombinant interferon-alpha 2a: Evidence of a selective effect on the malignant clone. *American Journal of Hematology* **56**, 126–128 (1997).

257. Messora, C. *et al.* Cytogenetic conversion in a case of polycythaemia vera treated with interferon-alpha. *British Journal of Haematology* **86**, 402–404 (1994).

258. Quintás-Cardama, A. *et al.* Pegylated interferon alfa-2a yields high rates of hematologic and molecular response in patients with advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5418–5424 (2009).

259. Gisslinger, H. *et al.* Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood* **121**, 1720–1728 (2013).

260. Gisslinger, H. *et al.* Ropeginterferon alfa-2b, a novel IFNα-2b, induces high response rates with low toxicity in patients with polycythemia vera. *Blood* **126**, 1762–1769 (2015).

261. Them, N. C. C. *et al.* Molecular responses and chromosomal aberrations in patients with polycythemia vera treated with peg-proline-interferon alpha-2b. *American Journal of Hematology* **90**, 288–294 (2015).

262. Jovanovic, J. V. *et al.* Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* **27**, 2032–2039 (2013).

263. Verger, E. *et al.* Clinical and molecular response to interferon-α therapy in essential thrombocythemia patients with CALR mutations. *Blood* **126**, 2585–2591 (2015).

264. Barosi, G. *et al.* Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. *Blood* **121**, 4778–4781 (2013).

265. Guglielmelli, P. *et al.* Ruxolitinib is an effective treatment for CALR-positive patients with myelofibrosis. *British Journal of Haematology* **173**, 938–940 (2016).

266. Baerlocher, G. M. *et al.* Telomerase Inhibitor Imetelstat in Patients with Essential Thrombocythemia. *http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1503479* https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1503479 (2015) doi:10.1056/NEJMoa1503479.

267. Tefferi, A. *et al.* A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 908–919 (2015).

268. Kiladjian, J.-J. *et al.* Clonal analysis of erythroid progenitors suggests that pegylated interferon alpha-2a treatment targets JAK2V617F clones without affecting TET2 mutant cells. *Leukemia* **24**, 1519–1523 (2010).

269. Quintás-Cardama, A. *et al.* Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α-2a. *Blood* **122**, 893–901 (2013).

270. Riley, C. H. *et al.* Increase in circulating CD4+CD25+Foxp3+ T cells in patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms during treatment with IFN-α. *Blood* **118**, 2170–2173 (2011).

271. Riley, C. H. *et al.* Expansion of circulating CD56bright natural killer cells in patients with JAK2-positive chronic myeloproliferative neoplasms during treatment with interferon-α. *European Journal of Haematology* **94**, 227–234 (2015).

272. Riley, C. H. *et al.* Interferon-α induces marked alterations in circulating regulatory T cells, NK cell subsets, and dendritic cells in patients with JAK2V617F-positive essential thrombocythemia and polycythemia vera. *European Journal of Haematology* **97**, 83–92 (2016).

273. Bacher, N., Graulich, E., Jonuleit, H., Grabbe, S. & Steinbrink, K. Interferon-α Abrogates Tolerance Induction by Human Tolerogenic Dendritic Cells. *PLOS ONE* **6**, e22763 (2011).

274. Kreutzman, A. *et al.* Chronic Myeloid Leukemia Patients in Prolonged Remission following Interferon-α Monotherapy Have Distinct Cytokine and Oligoclonal Lymphocyte Profile. *PLOS ONE* **6**, e23022 (2011).

275. Essers, M. A. G. *et al.* IFNα activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature* **458**, 904–908 (2009).

276. Pietras, E. M. *et al.* Re-entry into quiescence protects hematopoietic stem cells from the killing effect of chronic exposure to type I interferons. *J. Exp. Med.* **211**, 245–262 (2014).

277. Mullally, A. *et al.* Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon-α in a murine model of polycythemia vera. *Blood* **121**, 3692–3702 (2013).

278. Mullally, A. *et al.* Distinct roles for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. *Blood* **120**, 166–172 (2012).

279. Quintás-Cardama, A. *et al.* Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **115**, 3109–3117 (2010).

280. Harrison, C. *et al.* JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* **366**, 787–798 (2012).

281. Vannucchi, A. M. *et al.* Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* **372**, 426–435 (2015).

282. Al-Ali, H. K. *et al.* Safety and efficacy of ruxolitinib in an open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. *Haematologica* **101**, 1065–1073 (2016).

283. Harrison, C. N. *et al.* Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* **30**, 1701–1707 (2016).

284. Passamonti, F. *et al.* Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet Oncol.* **18**, 88–99 (2017).

285. Vannucchi, A. M. *et al.* Ruxolitinib reduces JAK2 p.V617F allele burden in patients with polycythemia vera enrolled in the RESPONSE study. *Ann. Hematol.* **96**, 1113–1120 (2017).

286. Shvidel, L. *et al.* Busulphan is safe and efficient treatment in elderly patients with essential thrombocythemia. *Leukemia* **21**, 2071–2072 (2007).

287. Najean, Y. & Rain, J. D. Treatment of polycythemia vera: use of 32P alone or in combination with maintenance therapy using hydroxyurea in 461 patients greater than 65 years of age. The French Polycythemia Study Group. *Blood* **89**, 2319–2327 (1997).

288. Ballen, K. K. *et al.* Outcome of transplantation for myelofibrosis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **16**, 358–367 (2010).

289. Robin, M. *et al.* Unrelated cord blood transplantation for patients with primary or secondary myelofibrosis. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **20**, 1841–1846 (2014).

290. Robin, M. *et al.* Ruxolitinib Before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) In Patients With myelofibrosis : a Preliminary Descriptive Report Of The JAK ALLO Study, a Phase II Trial Sponsored By Goelams-FIM In Collaboration With The Sfgmtc. *Blood* **122**, 306–306 (2013).

291. Hayflick, L. & Moorhead, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**, 585–621 (1961).

292. Hayflick, L. THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Exp. Cell Res.* **37**, 614–636 (1965).

293. Storer, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell* **155**, 1119–1130 (2013).

294. Muñoz-Espín, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell* **155**, 1104–1118 (2013).

295. Jun, J.-I. & Lau, L. F. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.* **12**, 676–685 (2010).

296. Demaria, M. *et al.* An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev. Cell* **31**, 722–733 (2014).

297. Krishnamurthy, J. *et al.* Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* **114**, 1299–1307 (2004).

298. Baker, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature* **479**, 232–236 (2011).

299. Baker, D. J. *et al.* Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* **530**, 184–189 (2016).

300. Childs, B. G. *et al.* Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science* **354**, 472–477 (2016).

301. Demaria, M. *et al.* Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov* **7**, 165–176 (2017).

302. Baar, M. P. *et al.* Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell* **169**, 132-147.e16 (2017).

303. Chang, J. *et al.* Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nat. Med.* **22**, 78–83 (2016).

304. Stein, G. H., Beeson, M. & Gordon, L. Failure to phosphorylate the retinoblastoma gene product in senescent human fibroblasts. *Science* **249**, 666–669 (1990).

305. Ezhevsky, S. A. *et al.* Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10699–10704 (1997).

306. Noda, A., Ning, Y., Venable, S. F., Pereira-Smith, O. M. & Smith, J. R. Cloning of senescent cell-derived inhibitors of DNA synthesis using an expression screen. *Exp. Cell Res.* **211**, 90–98 (1994).

307. Zhang, H., Xiong, Y. & Beach, D. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. *Mol. Biol. Cell* **4**, 897–906 (1993).

308. Kamijo, T. *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* **91**, 649–659 (1997).

309. Serrano, M., Hannon, G. J. & Beach, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366**, 704–707 (1993).

310. Alcorta, D. A. *et al.* Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 13742–13747 (1996).

311. Hara, E. *et al.* Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 859–867 (1996).

312. Wei, W., Herbig, U., Wei, S., Dutriaux, A. & Sedivy, J. M. Loss of retinoblastoma but not p16 function allows bypass of replicative senescence in human fibroblasts. *EMBO Rep* **4**, 1061–1066 (2003).

313. el-Deiry, W. S., Kern, S. E., Pietenpol, J. A., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat. Genet.* **1**, 45–49 (1992).

314. de Stanchina, E. *et al.* PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol. Cell* **13**, 523–535 (2004).

315. Kunz, C., Pebler, S., Otte, J. & von der Ahe, D. Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3710–3717 (1995).

316. Herbig, U., Jobling, W. A., Chen, B. P. C., Chen, D. J. & Sedivy, J. M. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol. Cell* **14**, 501–513 (2004).

317. Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D. & Lowe, S. W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**, 593–602 (1997).

318. Chang, B. D. *et al.* Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **18**, 4808–4818 (1999).

319. Carrel, A. ON THE PERMANENT LIFE OF TISSUES OUTSIDE OF THE ORGANISM. *J. Exp. Med.* **15**, 516–528 (1912).

320. Hsu, T. C. & Moorhead, P. S. Mammalian chromosomes in vitro. VII. Heteroploidy in human cell strains. *J. Natl. Cancer Inst.* **18**, 463–471 (1957).

321. Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725–734 (1998).

322. Jacobs, J. J. L., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R. A. & van Lohuizen, M. The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature* **397**, 164–168 (1999).

323. Bracken, A. P. *et al.* The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev.* **21**, 525–530 (2007).

324. Velimezi, G. *et al.* Functional interplay between the DNA-damage-response kinase ATM and ARF tumour suppressor protein in human cancer. *Nat. Cell Biol.* **15**, 967–977 (2013).

325. Evangelou, K. *et al.* The DNA damage checkpoint precedes activation of ARF in response to escalating oncogenic stress during tumorigenesis. *Cell Death Differ.* **20**, 1485–1497 (2013).

326. Roninson, I. B. & Dokmanovic, M. Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids. *J. Cell. Biochem.* **88**, 83–94 (2003).

327. Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. & Wahl, G. M. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* **8**, 2540–2551 (1994).

328. Lewis, D. A., Yi, Q., Travers, J. B. & Spandau, D. F. UVB-induced senescence in human keratinocytes requires a functional insulin-like growth factor-1 receptor and p53. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1346–1353 (2008).

329. Chen, Q. & Ames, B. N. Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4130–4134 (1994).

330. Parrinello, S. *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **5**, 741–747 (2003).

331. Allen, R. G., Tresini, M., Keogh, B. P., Doggett, D. L. & Cristofalo, V. J. Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *J. Cell. Physiol.* **180**, 114–122 (1999).

332. Hutter, E. *et al.* Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem. J.* **380**, 919–928 (2004).

333. Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J. D., Yan, L. J. & Ames, B. N. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 4337–4341 (1995).

334. Lee, A. C. *et al.* Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* **274**, 7936–7940 (1999).

335. Macip, S. *et al.* Inhibition of p21-mediated ROS accumulation can rescue p21-induced senescence. *EMBO J.* **21**, 2180–2188 (2002).

336. Alimonti, A. *et al.* A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **120**, 681–693 (2010).

337. Courtois-Cox, S. *et al.* A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell* **10**, 459–472 (2006).

338. Young, A. P. *et al.* VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat. Cell Biol.* **10**, 361–369 (2008).

339. Matheu, A. *et al.* Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev.* **18**, 2736–2746 (2004).

340. Bartkova, J. *et al.* Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **444**, 633–637 (2006).

341. Di Micco, R. *et al.* Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **444**, 638–642 (2006).

342. Palmero, I., Pantoja, C. & Serrano, M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* **395**, 125–126 (1998).

343. Gorgoulis, V. G. *et al.* Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* **434**, 907–913 (2005).

344. Acosta, J. C. *et al.* Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **133**, 1006–1018 (2008).

345. Coppé, J.-P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* **6**, 2853–2868 (2008).

346. Kuilman, T. *et al.* Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **133**, 1019–1031 (2008).

347. Xue, W. *et al.* Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **445**, 656–660 (2007).

348. Acosta, J. C. *et al.* A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature Cell Biology* **15**, 978–990 (2013).

349. Hubackova, S., Krejcikova, K., Bartek, J. & Hodny, Z. IL1- and TGFβ-Nox4 signaling, oxidative stress and DNA damage response are shared features of replicative, oncogene-induced, and drug-induced paracrine 'bystander senescence'. *Aging (Albany NY)* **4**, 932–951 (2012).

350. Trotman, L. C. *et al.* Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. *Nature* **441**, 523–527 (2006).

351. Wu, W.-S. *et al.* Promyelocytic leukemia protein sensitizes tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis by inhibiting the NF-kappaB survival pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 12294–12304 (2003).

352. Xu, Z.-X. *et al.* Promyelocytic leukemia protein 4 induces apoptosis by inhibition of survivin expression. *J. Biol. Chem.* **279**, 1838–1844 (2004).

353. Ito, K. *et al.* PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* **453**, 1072–1078 (2008).

354. de Thé, H., Chomienne, C., Lanotte, M., Degos, L. & Dejean, A. The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* **347**, 558–561 (1990).

355. Thé, H. de *et al.* The PML-RARα fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* **66**, 675–684 (1991).

356. Niwa-Kawakita, M. *et al.* PML is a ROS sensor activating p53 upon oxidative stress. *J. Exp. Med.* **214**, 3197–3206 (2017).

357. Chelbi-Alix, M. K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M. H. & de Thé, H. Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J. Virol.* **72**, 1043–1051 (1998).

358. Yang, S., Kuo, C., Bisi, J. E. & Kim, M. K. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat. Cell Biol.* **4**, 865–870 (2002).

359. Reymond, A. *et al.* The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J.* **20**, 2140–2151 (2001).

360. Tao, H. *et al.* Structure of the MID1 tandem B-boxes reveals an interaction reminiscent of intermolecular ring heterodimers. *Biochemistry* **47**, 2450–2457 (2008).

361. Kastner, P. *et al.* Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor alpha fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL): structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J.* **11**, 629–642 (1992).

362. Müller, S., Matunis, M. J. & Dejean, A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J.* **17**, 61–70 (1998).

363. Fagioli, M. *et al.* Alternative splicing of PML transcripts predicts coexpression of several carboxy-terminally different protein isoforms. *Oncogene* **7**, 1083–1091 (1992).

364. Lin, H.-K., Bergmann, S. & Pandolfi, P. P. Cytoplasmic PML function in TGF-β signalling. *Nature* **431**, 205–211 (2004).

365. Giorgi, C. *et al.* PML Regulates Apoptosis at Endoplasmic Reticulum by Modulating Calcium Release. *Science* **330**, 1247–1251 (2010).

366. Ferbeyre, G. *et al.* PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev.* **14**, 2015–2027 (2000).

367. Wimmer, P. *et al.* PML isoforms IV and V contribute to adenovirus-mediated oncogenic transformation by functionally inhibiting the tumor-suppressor p53. *Oncogene* **35**, 69–82 (2016).

368. Guo, A. *et al.* The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 730–736 (2000).

369. Hayakawa, F. & Privalsky, M. L. Phosphorylation of PML by mitogen-activated protein kinases plays a key role in arsenic trioxide-mediated apoptosis. *Cancer Cell* **5**, 389–401 (2004).

370. Hayakawa, F., Abe, A., Kitabayashi, I., Pandolfi, P. P. & Naoe, T. Acetylation of PML is involved in histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 24420–24425 (2008).

371. Scaglioni, P. P. *et al.* A CK2-dependent mechanism for degradation of the PML tumor suppressor. *Cell* **126**, 269–283 (2006).

372. Lallemand-Breitenbach, V. *et al.* Arsenic degrades PML or PML-RARalpha through a SUMO-triggered RNF4/ubiquitin-mediated pathway. *Nat. Cell Biol.* **10**, 547–555 (2008).

373. Tatham, M. H. *et al.* RNF4 is a poly-SUMO-specific E3 ubiquitin ligase required for arsenic-induced PML degradation. *Nat. Cell Biol.* **10**, 538–546 (2008).

374. Gurrieri, C. *et al.* Loss of the tumor suppressor PML in human cancers of multiple histologic origins. *J. Natl. Cancer Inst.* **96**, 269–279 (2004).

375. Bischof, O. *et al.* Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J.* **21**, 3358–3369 (2002).

376. Pearson, M. *et al.* PML regulates p53 acetylation and premature senescence induced by oncogenic Ras. *Nature* **406**, 207–210 (2000).

377. Bernardi, R. *et al.* PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **6**, 665–672 (2004).

378. Haupt, S. *et al.* Loss of PML cooperates with mutant p53 to drive more aggressive cancers in a gender-dependent manner. *Cell Cycle* **12**, 1722–1731 (2013).

379. Louria-Hayon, I. *et al.* The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *J. Biol. Chem.* **278**, 33134–33141 (2003).

380. Alsheich-Bartok, O. *et al.* PML enhances the regulation of p53 by CK1 in response to DNA damage. *Oncogene* **27**, 3653–3661 (2008).

381. Hofmann, T. G. *et al.* Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat. Cell Biol.* **4**, 1–10 (2002).

382. Mallette, F. A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.-F., Moiseeva, O. & Ferbeyre, G. Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene* **23**, 91–99 (2004).

383. Le, X. F., Vallian, S., Mu, Z. M., Hung, M. C. & Chang, K. S. Recombinant PML adenovirus suppresses growth and tumorigenicity of human breast cancer cells by inducing G1 cell cycle arrest and apoptosis. *Oncogene* **16**, 1839–1849 (1998).

384. Rastogi, S. *et al.* Prohibitin facilitates cellular senescence by recruiting specific corepressors to inhibit E2F target genes. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4161–4171 (2006).

385. Narita, M. *et al.* Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell* **113**, 703–716 (2003).

386. Stadler, M. *et al.* Transcriptional induction of the PML growth suppressor gene by interferons is mediated through an ISRE and a GAS element. *Oncogene* **11**, 2565–2573 (1995).

387. Moiseeva, O., Mallette, F. A., Mukhopadhyay, U. K., Moores, A. & Ferbeyre, G. DNA Damage Signaling and p53-dependent Senescence after Prolonged β-Interferon Stimulation. *MBoC* **17**, 1583–1592 (2006).

388. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M.-F., Huot, G. & Ferbeyre, G. Myc down-regulation as a mechanism to activate the Rb pathway in STAT5A-induced senescence. *J. Biol. Chem.* **282**, 34938–34944 (2007).

389. Oh, W. *et al.* PML-IV functions as a negative regulator of telomerase by interacting with TERT. *J. Cell. Sci.* **122**, 2613–2622 (2009).

390. Zhu, J. *et al.* Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: Implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *PNAS* **94**, 3978–3983 (1997).

391. Shao, W. *et al.* Arsenic Trioxide as an Inducer of Apoptosis and Loss of PML/RARα Protein in Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *J Natl Cancer Inst* **90**, 124–133 (1998).

392. Lallemand-Breitenbach, V. *et al.* Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As2O3-induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation. *J. Exp. Med.* **193**, 1361–1371 (2001).

393. Zhang, X.-W. *et al.* Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML. *Science* **328**, 240–243 (2010).

394. Ablain, J. *et al.* Activation of a promyelocytic leukemia-tumor protein 53 axis underlies acute promyelocytic leukemia cure. *Nat. Med.* **20**, 167–174 (2014).

395. El Hajj, H. *et al.* Therapy-induced selective loss of leukemia-initiating activity in murine adult T cell leukemia. *J. Exp. Med.* **207**, 2785–2792 (2010).

396. Dassouki, Z. *et al.* ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation. *Blood* **125**, 474–482 (2015).

397. El Hajj, H. *et al.* Arsenic Trioxide and Interferon-Alpha Eradicate Adult T Cell Leukemia Initiating Cells through PML/p53 Senescence and Activation of Innate Immunity. *Blood* **130**, 1233–1233 (2017).

398. Kchour, G. *et al.* Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* **113**, 6528–6532 (2009).

399. Dimri, G. P. *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9363–9367 (1995).

400. Gerland, L.-M. *et al.* Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp. Gerontol.* **38**, 887–895 (2003).

401. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. & Narita, M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* **28**, 99–114 (2014).

402. Qian, Y., Zhang, J., Yan, B. & Chen, X. DEC1, a basic helix-loop-helix transcription factor and a novel target gene of the p53 family, mediates p53-dependent premature senescence. *J. Biol. Chem.* **283**, 2896–2905 (2008).

403. Collado, M. *et al.* Senescence in premalignant tumours. *Nature* **436**, 642–642 (2005).

404. Byun, H.-O. *et al.* Cathepsin D and eukaryotic translation elongation factor 1 as promising markers of cellular senescence. *Cancer Res.* **69**, 4638–4647 (2009).

405. d'Adda di Fagagna, F. *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* **426**, 194–198 (2003).

406. Shao, L. *et al.* Total body irradiation causes long-term mouse BM injury via induction of HSC premature senescence in an Ink4a- and Arf-independent manner. *Blood* **123**, 3105–3115 (2014).

407. Besancenot, R. *et al.* A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. *PLoS Biol.* **8**, (2010).

408. Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* **455**, 1061–1068 (2008).

409. Patel, P. L., Suram, A., Mirani, N., Bischof, O. & Herbig, U. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *PNAS* **113**, E5024–E5033 (2016).

410. Ito, T., Teo, Y. V., Evans, S. A., Neretti, N. & Sedivy, J. M. Regulation of Cellular Senescence by Polycomb Chromatin Modifiers through Distinct DNA Damage- and Histone Methylation-Dependent Pathways. *Cell Rep* **22**, 3480–3492 (2018).

411. Yu, Y. *et al.* Targeting the Senescence-Overriding Cooperative Activity of Structurally Unrelated H3K9 Demethylases in Melanoma. *Cancer Cell* **33**, 322-336.e8 (2018).

412. Fan, T. *et al.* EZH2-dependent suppression of a cellular senescence phenotype in melanoma cells by inhibition of p21/CDKN1A expression. *Mol. Cancer Res.* **9**, 418–429 (2011).

413. Roberson, R. S., Kussick, S. J., Vallieres, E., Chen, S.-Y. J. & Wu, D. Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* **65**, 2795–2803 (2005).

414. Wang, E. S. *et al.* Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: in vitro and in vivo studies in multiple myeloma and lymphoma. *Blood* **103**, 258–266 (2004).

415. Campaner, S. *et al.* Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat. Cell Biol.* **12**, 54–59; sup pp 1-14 (2010).

416. Guan, X. *et al.* Stromal Senescence By Prolonged CDK4/6 Inhibition Potentiates Tumor Growth. *Mol. Cancer Res.* **15**, 237–249 (2017).

417. Vassilev, L. T. *et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **303**, 844–848 (2004).

418. Bykov, V. J. N. *et al.* Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nat. Med.* **8**, 282–288 (2002).

419. Kalathur, M. *et al.* A chemogenomic screening identifies CK2 as a target for pro-senescence therapy in PTEN-deficient tumours. *Nat Commun* **6**, 1–12 (2015).

420. Luo, X. *et al.* Stromal-Initiated Changes in the Bone Promote Metastatic Niche Development. *Cell Rep* **14**, 82–92 (2016).

421. Ruhland, M. K. *et al.* Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nat Commun* **7**, 11762 (2016).

422. Toso, A. *et al.* Enhancing chemotherapy efficacy in Pten-deficient prostate tumors by activating the senescence-associated antitumor immunity. *Cell Rep* **9**, 75–89 (2014).

423. Milanovic, M. *et al.* Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* (2017) doi:10.1038/nature25167.

424. Wang, L. *et al.* High-Throughput Functional Genetic and Compound Screens Identify Targets for Senescence Induction in Cancer. *Cell Rep* **21**, 773–783 (2017).

425. Yosef, R. *et al.* Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nat Commun* **7**, 11190 (2016).

426. Zhu, Y. *et al.* Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell* **15**, 428–435 (2016).

427. Triana-Martínez, F. *et al.* Identification and characterization of Cardiac Glycosides as senolytic compounds. *Nat Commun* **10**, 4731 (2019).

428. Guerrero, A. *et al.* Cardiac glycosides are broad-spectrum senolytics. *Nat Metab* **1**, 1074–1088 (2019).

429. Fleury, H. *et al.* Exploiting interconnected synthetic lethal interactions between PARP inhibition and cancer cell reversible senescence. *Nat Commun* **10**, 2556 (2019).

430. Tasdemir, N. *et al.* BRD4 Connects Enhancer Remodeling to Senescence Immune Surveillance. *Cancer Discov* **6**, 612–629 (2016).

431. Georgilis, A. *et al.* PTBP1-Mediated Alternative Splicing Regulates the Inflammatory Secretome and the Pro-tumorigenic Effects of Senescent Cells. *Cancer Cell* **34**, 85-102.e9 (2018).

432. Dörr, J. R. *et al.* Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature* **501**, 421–425 (2013).

433. Fu, S. *et al.* The key role of PML in IFN-α induced cellular senescence of human mesenchymal stromal cells. *Int. J. Oncol.* **46**, 351–359 (2015).

434. Hubackova, S. *et al.* Regulation of the PML tumor suppressor in drug-induced senescence of human normal and cancer cells by JAK/STAT-mediated signaling. *Cell Cycle* **9**, 3085–3099 (2010).

435. Besancenot, R. *et al.* JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood* **124**, 2104–2115 (2014).

436. Guadall, A. *et al.* Endothelial Cells Harbouring the JAK2V617F Mutation Display Pro-Adherent and Pro-Thrombotic Features. *Thromb. Haemost.* **118**, 1586–1599 (2018).

437. Spivak, J. L. Myeloproliferative Neoplasms. *http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1406186* https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1406186?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed (2017) doi:10.1056/NEJMra1406186.

438. Berk, P. D. *et al.* Increased Incidence of Acute Leukemia in Polycythemia Vera Associated with Chlorambucil Therapy. *New England Journal of Medicine* **304**, 441–447 (1981).

439. Roos, G., Leanderson, T. & Lundgren, E. Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells. *Cancer Res.* **44**, 2358–2362 (1984).

440. Spets, H., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K. & Jernberg-Wiklund, H. Fas/APO-1 (CD95)-mediated apoptosis is activated by interferon-gamma and interferon- in interleukin-6 (IL-6)-dependent and IL-6-independent multiple myeloma cell lines. *Blood* **92**, 2914–2923 (1998).

441. Sangfelt, O., Erickson, S., Einhorn, S. & Grandér, D. Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Oncogene* **14**, 415–423 (1997).

442. Marty, C. *et al.* A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* **27**, 2187–2195 (2013).

443. Mallette, F. A., Gaumont-Leclerc, M.-F. & Ferbeyre, G. The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev.* **21**, 43–48 (2007).

444. Kirschner, K. *et al.* Proliferation Drives Aging-Related Functional Decline in a Subpopulation of the Hematopoietic Stem Cell Compartment. *Cell Rep* **19**, 1503–1511 (2017).

445. Sedek, M. & Strous, G. J. SUMOylation is a regulator of the translocation of Jak2 between nucleus and cytosol. *Biochem. J.* **453**, 231–239 (2013).

446. Lv, K. *et al.* CBL family E3 ubiquitin ligases control JAK2 ubiquitination and stability in hematopoietic stem cells and myeloid malignancies. *Genes Dev.* **31**, 1007–1023 (2017).

447. Vernier, M. *et al.* Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev.* **25**, 41–50 (2011).

448. El Eit, R. M. *et al.* Effective targeting of chronic myeloid leukemia initiating activity with the combination of arsenic trioxide and interferon alpha. *Int. J. Cancer* **134**, 988–996 (2014).

ECOLE DOCTORALE
Hématologie - Oncogenèse - Biothérapies

Effets et mécanismes d'actions de l'interféron alpha associé au trioxyde d'arsenic dans les Néoplasies Myéloprolifératives mutées *JAK2V617F*

Les Néoplasies Myéloprolifératives BCR-ABL-négatifs (NMP) forment un groupe hétérogène d'hémopathies myéloïdes chroniques ayant pour origine une anomalie de la cellule souche hématopoïétique aboutissant à la transformation maligne d'un progéniteur myéloïde et sont caractérisées par une prolifération excessive de cellules matures myéloïdes (Globules rouges, plaquettes et/ou leucocytes). Elles regroupent essentiellement la Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocytémie Essentielle et La Myélofibrose Primitive. L'anomalie en cause est due dans 60-70% des cas à une acquisition de la mutation *JAK2V617F,* reconnue comme « driver » de la maladie. Il existe cependant encore des formes de Néoplasie Myéloprolifératives non caractérisées moléculairement. D'autre part, aucun traitement ne permet aujourd'hui de guérir les malades, hormis la transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Seul l'interféron alpha a permis à ce jour d'entrainer des réponses hématologiques et moléculaires complètes. Cependant, une proportion non négligeable (20-25%) de patients reste réfractaire ou échappe à ce traitement. L'objectif de ce travail de thèse répond donc à une démarche intégrative autour de l'étude de ce groupe de pathologies. En effet, nous avons dans un premier temps travaillé sur le paysage moléculaire des NMP et avons décrit et caractérisé dans notre cohorte de nouveaux variants moléculaires retrouvés dans les NMP. La deuxième partie du travail repose sur des aspects thérapeutiques par l'exploration du mécanisme d'action de l'IFN, une drogue déjà largement utilisée dans ces maladies, seul et en association au trioxyde d'arsenic. Nous montrons que les cellules de NMP mutées *JAK2V617F* traitées par interféron présentent des caractéristiques de sénescence potentialisée par l'ajout de trioxyde d'arsenic, et que l'induction de ce profil de sénescence passe par la protéine PML et la formation de corps nucléaires à PML.

Mots-clés : Néoplasies Myéloprolifératives, JAK2V617F, Interféron alpha, trioxyde d'arsenic, PML

Effects and mechanisms of action of arsenic Trioxide-associated Interferon Alpha in *JAK2V617F*-mutated Myeloproliferative Neoplasms

BCR-ABL-Negative Myeloproliferative Neoplasms (MPN) is a heterogeneous group of chronic myeloid malignancies that rises from a hematopoietic stem cell defect, leading to the transformation of a myeloid progenitor and is characterized by excessive proliferation of mature myeloid cells (red blood cells, platelets and/or leukocytes). They essentially include Polycythemia Vera, Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. 60-70% of cases are due to an acquisition of the *JAK2V617F* mutation, well-known "driver" of the disease. However, there are still forms of Myeloproliferative Neoplasia that are not molecularly characterized. Moreover, no treatment today makes it possible to cure patients, except for hematopoietic stem cell transplantation. To date, only interferon alpha has made it possible to induce complete hematological and molecular responses. However, a non-negligible proportion (20-25%) of patients remain refractory or escape this treatment. The objective of this thesis work is therefore an integrative approach to the study of this group of diseases. Indeed, we first worked on the molecular landscape of MPN and described and characterized in our cohort new molecular variants. The second part of the work focuses on therapeutic aspects. We explored the mechanism of action of IFN, a drug already widely used in these diseases, alone and in combination with arsenic trioxide. We show that *JAK2V617F* mutated MPN cells treated with interferon show senescence features and is potentiated by the addition of arsenic trioxide. The induction of this senescence profile is mediated by PML, a well-known interferon target, and the formation of PML nuclear bodies.

Keywords : Myeloproliferative Néoplasms, JAK2V617F, Interferon alpha, arsenic trioxide, PML

INSTITUT DE RECHERCHE SAINT-LOUIS
Hématologie I Immunologie I Oncologie

Université de Paris