Université Paris Cité
École doctorale n°561 Hématologie, Oncologie et biothérapies
Unité de recherche Inserm 1287 « Cellules souches hématopoïétiques et développement des hémopathies myéloïdes »
Équipe 2 « Des cellules souches hématopoïétiques aux mégacaryocytes »

Étude des mécanismes d'action expliquant les différences phénotypiques entre les mutants de la calréticuline *del52* et *ins5* dans les néoplasmes myéloprolifératifs

Camélia BENLABIOD

Thèse de doctorat d'Hématologie
Dirigée par Caroline MARTY et Isabelle PLO

Thèse présentée et soutenue publiquement le 30 novembre 2022

Composition du jury :

Carmen GARRIDO-FLEURY DR, Université de Bourgogne	Rapportrice
Cyril BROCCARDO DR, Université Toulouse III Paul Sabatier	Rapporteur
Karl BALABANIAN DR, Université Paris Cité	Examinateur
Stéphane PROST CR HDR, Université Paris-Saclay	Examinateur
Caroline MARTY CR HDR, Université Paris Cité	Directrice de thèse
Isabelle PLO DR, Université Paris Cité	Co-Directrice de thèse

Étude des mécanismes d'action expliquant les différences phénotypiques entre les mutants de la calréticuline *del52* et *ins5* dans les néoplasmes myéloprolifératifs

Les néoplasmes myéloprolifératifs classiques (NMP) sont des maladies malignes clonales de la cellule souche hématopoïétique (CSH) caractérisées par la production incontrôlée des cellules matures du sang : les plaquettes dans la thrombocytémie essentielle (TE), les globules rouges dans la polyglobulie de Vaquez (PV) et les granuleux dans la myélofibrose primaire (MFP) également associée à une hyperplasie des mégacaryocytes (MK) de la moelle osseuse (MO) ainsi qu'à la présence invalidante de fibres de collagène. La myélofibrose (MF) est la forme la plus sévère et hétérogène des NMP. Les NMP sont dus à l'acquisition de mutations gain-de-fonction affectant la kinase JAK2, la calréticuline (CALR) et le récepteur à la thrombopoïétine (TPO) MPL. Ces mutations conduisent à l'activation constitutive de la signalisation JAK2/STAT en aval des récepteurs des cytokines et à une prolifération myéloïde incontrôlée. Les mutations de *CALR* (*CALRmut*) sont associées à environ 30% des TE et des MFP. Deux types de CALRmut sont plus fréquentes, *CALRdel52* et *CALRins5* sont trouvées dans la TE, tandis que *CALRdel52* est prédominante dans la MFP. Le but du mon projet de thèse est de comprendre les bases des différences phénotypiques induites par les deux types de *CALRmut, CALRdel52* et *CALRins5*, à l'aide de modèles de souris knock-in (KI) générées dans le laboratoire. Ces souris expriment les CALRdel52 et CALRins5 murines avec la queue C-terminale mutée humaine. L'étude comparative de l'hématopoïèse des souris KI *CALRdel52* et KI *CALRins5* a montré que les souris KI *CALRdel52* développent un phénotype plus sévère que les souris KI *CALRins5* en termes de thrombocytose et de progression en MF, et en contexte homozygote qu'hétérozygote. L'amplification et l'avantage compétitif des CSH, ainsi que l'amplification des MK, sont les plus importants dans le contexte homozygote *CALRdel52*. Le phénotype des hétérozygotes *CALRins5* est similaire à celui des contrôles, tandis que les hétérozygotes *CALRdel52* développent une maladie intermédiaire. Mêmes si ces souris miment globalement la maladie humaine avec un effet plus sévère CALRdel52 comparé à CALRins5, nous avons observé des phénotypes plus modérés que chez les patients en termes de thrombocytose et de progression en myélofibrose, particulièrement pour les souris hétérozygotes. Nous avons démontré que les différences homme/souris étaient dues à une activation suboptimale de la voie JAK2/STAT5 par le MPL murin par rapport au MPL humain quelques soit les mutants (tests de luciférase in vitro). De plus, à l'aide d'une greffe compétitive (2:8) entre des clones homozygotes *CALRins5* et des clones hétérozygotes

CALRins5 nous avons trouvé que l'homozygotie, plus souvent observée chez les patients *CALRins5* que *CALRdel52*, joue un rôle essentiel dans la sévérité de la thrombocytose et permet d'atteindre ou de dépasser la thrombocytose induite par *CALRdel52* (Benlabiod et al., 2020). La deuxième partie de mon travail s'est concentrée sur l'étude des mécanismes permettant d'expliquer la différence de phénotype entre ces deux mutants. Grâce à des analyses par cytométrie en flux, il a été observé que les CSH *CALRdel52* homozygotes se divisent plus que les CSH homozygotes *CALRins5*. Les analyses à l'échelle unicellulaire de cytométrie de masse et de scRNA-seq ont montré des différences de signatures entre les deux *CALRmut*, au niveau de la réponse au stress du RE.

Mots clés : Néoplasmes myéloprolifératifs, Cellule souche hématopoïétique, Calréticuline, Mégacaryocyte, Modèle de souris knock-in.

Study of the mechanisms of action explaining the phenotypic differences between *del52* and *ins5* calreticulin mutants in myeloproliferative neoplasms

Classical myeloproliferative neoplasms (MPNs) are clonal malignant diseases of the hematopoietic stem cell (HSC)characterized by the exaggerated production of mature blood cells: platelets in essential thrombocythemia (ET), red blood cells in polycythemia Vera (PV), and granules in primary myelofibrosis (PMF) also associated with bone marrow (BM)megakaryocyte (MK) hyperplasia and the disabling presence of collagen fibers. Myelofibrosis (MF) is the most severe and heterogeneous form of MPN. MPNs are due to the acquisition of gain-of-function mutations affecting the JAK2 kinase, calreticulin (CALR) and the thrombopoietin receptor (TPO) MPL. These mutations lead to constitutive activation of JAK2/STAT signaling downstream of cytokine receptors and uncontrolled myeloid proliferation. Mutations in CALR (CALRmut) are associated with approximately 30% of ETs and PMFs. Two types of *CALRmut* are more frequent, *CALRdel52* and *CALRins5* are found in ET, while *CALRdel52* is predominant in MFP. The goal of my thesis project is to understand the basis of the phenotypic differences induced by the two types of *CALRmut*, *CALRdel52* and *CALRins5*, using knock-in (KI) mouse models generated in the laboratory. These mice express murine *CALRdel52* and *CALRins5* with the human mutated C-terminal tail. Comparative study of the hematopoiesis of KI *CALRdel52* and KI *CALRins5* mice showed that *CALRdel52* mice develop a more severe phenotype than KI *CALRins5* mice in terms of thrombocytosis and progression to MF, and in homozygous than heterozygous context. HSC amplification and competitive advantage, as well as MK amplification, are most prominent in the *CALRdel52* homozygous context. The phenotype of heterozygous *CALRins5* is almost indistinguishable from that of controls, whereas heterozygous *CALRdel52* develop intermediate disease. Although these mice globally mimic human disease with a more severe effect of *CALRdel52* compared to *CALRins5*, we observed more moderate phenotypes than patients in terms of thrombocytosis and progression to myelofibrosis, particularly for heterozygous mice. We demonstrated that the human/mouse differences were due to suboptimal activation of theJAK2/STAT5 pathway by murine MPL compared to human MPL regardless of mutants (in vitro luciferase assays).Furthermore, using a competitive grafting (2:8) between *CALRins5* homozygous and *CALRins5* heterozygous clones we found that homozygosity, more often observed in *CALRins5* than *CALRdel52* patients, plays a key role in the severity of thrombocytosis and allows to reach or exceed *CALRdel52* induced thrombocytosis (Benlabiod

et al., 2020). The second part of my work focused on investigating the mechanisms that explain the difference in phenotype between these two mutants. Using flow cytometry analysis, it was observed that *CALRdel52* homozygous HSCs divide more than *CALRins5* homozygous HSCs. In parallel, I could observe a different signaling in the stress response pathway between the two mutant HSCs by mass cytometry and scRNA-seq.

Key words: Myeloproliferative neoplasms, Hematopoietic stem cell, Calreticulin, Megakaryocyte, Knock-in mouse model.

Table des matières

Study of the mechanisms of action explaining the phenotypic differences between del52 and ins5 calreticulin mutants in myeloproliferative neoplasms 4

Table des matières 6

Liste des illustrations 8

Liste des tableaux 9

Liste des abréviations 10

Introduction 12

Chapitre I L'hématopoïèse 12

I. Généralités 12

II. Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse 15

1. Formation des MK polyploïdes et thrombopoïèse 15
2. Voies de signalisation régulant la mégacaryopoïèse 16
3. Régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse 19

III. Cellules souches hématopoïétiques 20

1. Définition phénotypique 21
2. Définition fonctionnelle 23
3. Régulation des CSH 25

Chapitre II Les Néoplasmes Myéloprolifératifs Classiques 29

I. Définition 29

II. Mutations motrices 30

1. Mutations du gène codant pour la protéine JAK2 30
2. Mutations de *MPL* 31
3. Mutations de la calréticuline 32

III. Mutations additionnelles/associées 32

IV. Comparaison des NMP mutés *JAK2*^{V617F} *vs. CALR vs. MPL* 32

V. Traitements 35

Chapitre III La Calréticuline 37

I. Rôle physiologique de la CALR 37

1. Structure de la CALR 37
2. Repliement des protéines membranaires et de sécrétion 38
i. Les chaperonnes ou lectines liant les motifs N-glycosylés 38
ii. La voie de réponse UPR au stress du RE 40
3. CALR et la régulation de l'homéostasie calcique 42
4. Rôle de CALR dans l'immunité 44

II. Mutations de *CALR* 44

1. Impact des mutations *CALR* dans les NMP 44
2. Impact des mutants CALR sur le stress RE 47
3. Impact des mutants CALR sur l'immunité 48

III. Modèles de souris 48

Objectif de la thèse 111

Partie 1 - Étude comparative de l'effet de CALRdel52 et CALRins5 sur hématopoïèse des souris KI *112*

Parties 2 et 3 : Étude de l'effet des CALRmut sur les CSH et mécanismes impliqués dans la différence de phénotype entre CALRdel52 et CALRins5 ..... *128*

Matériels et méthodes *128*

Résultats *135*

I. Effet des mutations *CALRdel52* et *CALRins5* au niveau des CSH 135

1. Les CSH *CALRdel52* se divisent plus que les CSH *CALRins5* et WT 135
2. Effet des *CALRmut* sur l'hétérogénéité des CSH 136

II. Étude des mécanismes impliqués dans la différence de phénotype entre *CALRdel52* et *CALRins5*. 139

Discussion *146*

Bibliographie *155*

Annexes *177*

Liste des illustrations

Figure 1 Schéma classique de la hiérarchie hématopoïétique. 13
Figure 2 Signalisation induite par la fixation de la TPO sur son récepteur MPL. 18
Figure 3 Schéma récapitulatif des différents facteurs et marqueurs de la mégacaryopoïèse (inspiré de Lanza et al, 2018). 20
Figure 4 Caractérisation phénotypique des CSH dans la MO par cytométrie en flux (adapté de Pietras et al, 2015). 22
Figure 5 Représentation de la hiérarchie hématopoïétique en milieu semi-solide. 23
Figure 6 Contournement de la voie classique de la mégacaryopoïèse en condition de stress (Sanjuan-Pla et al, 2013). 25
Figure 7 Classification des NMP selon l'OMS. 29
Figure 8 Les mutations motrices dans les NMP. 30
Figure 9 Structure de la CALR et fonctions de ses domaines. 37
Figure 10 Cycle CALR/CNX (Ellgaard et Frickel, 2003). 40
Figure 11 Voies ATF6, PERK et IRE1 de la réponse au stress du RE (UPR). 42
Figure 12 Régulation calcique dépendante du complexe STIM1-ERp57-CALR en aval de MPL. 43
Figure 13 Structure protéique de la CALR et ses mutants les plus fréquents. 45
Figure 14 Fonctionnement de la technologie de cytométrie de masse par temps de vol (CyTOF). 131
Figure 15 Stratégie de nettoyage des données brutes de CyTOF. 132
Figure 16 Stratégie de greffe compétitive des cellules vWF-GFP. 134
Figure 17 Étude de la division des CSH CALRdel52 et CALRins5 136
Figure 18 Rôle de CALRdel52 sur le biais mégacaryocytaire. 138
Figure 19 Méthode d'analyse des données de CyTOF. 140
Figure 20 Étude de la signalisation cellulaire dans la lignée MK par CyTOF. 141
Figure 21 Etude de l'impact des CALRmut sur le compartiment des progéniteurs et CSH par scRNA-seq. 143
Figure 22 Effet des CALRmut sur le stress du RE. 145
Figure 23 Analyse de l'accumulation de protéines mal repliées avec la sonde Protéostat dans les CSH et les progéniteurs (n=1). 152
Figure 24 Niveau d'expression des p-STAT par CytTOF. 155
Figure 25 Greffe compétitive de cellules induites avant ou après greffe. 177
Figure 26 Mesure de la concentration de CALR plasmatique par ELISA. 178
Figure 27 Voies enrichies par les CALRmut par RNAseq. 179

Liste des tableaux

Tableau 1 Comparaison des TE mutées JAK2V617F, CALRdel52 et CALRins5 33
Tableau 2 Récapitulatif des modèles de souris portant des CALRmut. 50

Liste des abréviations

A	Ang-1	Angiopoïétine-1
	ATF6	*Activating transcription factor 6*
B	BFU-E	*Burst forming unit–erythrocytes*
	BiP	*Immunoglobulin binding protein*
C	CALR	Calréticuline
	CBL	*Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene*
	CFU	*Colony forming unit*
	CFU-E	*Colony forming unit–erythrocytes*
	CFU-GEMM	*Colony forming unit granulocyte erythro-megakaryocyte monocyte*
	CFU-GM	*CFU-granulocyte monocyte*
	CFU-MK	*Colony forming unit–megakaryocytes*
	CMH	Complexe d'histocompatibilité majeur
	CNX	Calnexine
	CPSH	Cellules et progéniteurs souches hématopoïétiques
	CSF	Colony stimulating factor
	CSH	Cellule souche hématopoïétique
	CSM	Cellules souches mésenchymateuses
E	EPO	Erythropoïétine
	ERAD	Dégradation associée au RE
	ERK	*Extracellular signal-regulated kinases*
G	G-CSF	*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*
	G-CSFR	Récepteur au Granulocyte-Colony Stimulating Factor
	GRP78	*Glucose Related Protein of 78 kDa*
H	HIF-1	*Hypoxia-inducible factor-1*
	HSPA5	*Heat Shock 70 kDa Protein 5*
	HU	Hydroxyurée
I	IFNα	Interféron α
	IRE1	*Inositol requiring kinase 1*
J	JAK2	*Janus kinase 2*
	JH1	*JAK homologous 1*
K	KO	*Knock-out*
L	LAM	Leucémie aigue myéloïde
	Lin-	*Lineage negative*
	LMC	Leucémie myéloïde chronique
	LSK	Lin-Sca-1+C-Kit+
	LT	Long terme
M	Manf	*Mesencephalic Astrocyte Derived Neurotrophic Factor*
	MAPK	Protéine kinase activée par des agents mitogènes

	MF	Myélofibrose
	MFP	Myélofibrose primaire
	MK	Mégacaryocytes
	MO	Moelle osseuse
	MPL	*Myeloproliferative Leukemia*
	MPP	Progéniteurs multipotents
N	NMP	Néoplasmes myéloprolifératifs
O	ORAI	*Calcium release activated channel*
P	PEM	Progéniteurs érythro-mégacaryocytaires
	PERK	*Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*
	PI3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
	PLC	Progéniteurs lymphoïdes communs
	PMC	Progéniteurs myéloïdes communs
	PMG	Progéniteurs myélo-granulocytaires
	PMN	Polymorphonucléaires
	PNN	Polynucléaires neutrophiles
	PV	Polyglobulie de Vaquez
R	RE	Réticulum endoplasmique
	RV	Retroviral
S	SCF	*Stem cell factor*
	SH2	*Src homology 2*
	SOCE	*Stored-operated calcium entry*
	SOCS	*Suppressors of cytokine signaling*
	ST	Court terme
	STAT	*Signal transducers and activators of transcription*
	STIM1	*Stromal interaction molecule 1*
T	TAP	*Transporter associated with antigen processing*
	TE	Thrombocytémie essentielle
	TGF-β	*Transforming growth factor-beta*
	TLR	*Toll like receptor*
	TPO	Thrombopoïétine
U	UGGT	*UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase*
	UPR	*Unfolded Protein Response*
V	vWF	Facteur de von Willebrand

Introduction

Chapitre I L'hématopoïèse

I. Généralités

L'hématopoïèse est le processus finement régulé qui permet la génération de l'ensemble des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes, et débute dès le développement embryonnaire dans le sac vitellin pour se poursuivre tout au long de la vie adulte dans la moelle osseuse (MO). Au sein de l'environnement médullaire, les CSH sont localisées dans une niche qui participe au maintien de leurs capacités d'auto-renouvèlement et assure également leur engagement ou différentiation vers les lignées myéloïde et lymphoïde (Chow et al., 2001 ; Kubota, Takubo, et Suda, 2008). La niche est constituée de plusieurs types cellulaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie, notamment d'ostéoblastes, de cellules endothéliales, de cellules stromales mésenchymateuses (CSM), de neurones, et de cellules hématopoïétiques et est généralement considérée comme hypoxique (Morrison et Spradling, 2008). Classiquement, l'hématopoïèse se fait à partir d'une CSH de la MO qui est capable d'auto-renouvèlement et de différenciation en toutes les lignées de l'hématopoïèse (Jacobson et al., 1951). L'hématopoïèse a d'abord été décrite comme un processus pyramidal avec la CSH à son sommet, donnant naissance à des progéniteurs oligopotents communs de la lignée myéloïde (PMC) et de la lignée lymphoïde (PLC) par division asymétrique, qui s'engagent par des étapes successives de différenciation pour générer, dans le cas des PMC, des progéniteurs bipotents érythro-mégacaryocytaires (PEM) et myélo-granulocytaires (PMG), puis des progéniteurs unipotents, des précurseurs et enfin les cellules matures du sang (Morrison, Uchida, et Weissman, 1995 ; Weissman et Shizuru, 2008). Dans le sang, les cellules de la lignée myéloïde sont les érythrocytes, les plaquettes, les monocytes et granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles) et de la lignée lymphoïde sont les lymphocytes B et T, les cellules *Natural Killer* et les cellules dendritiques (Figure 1).

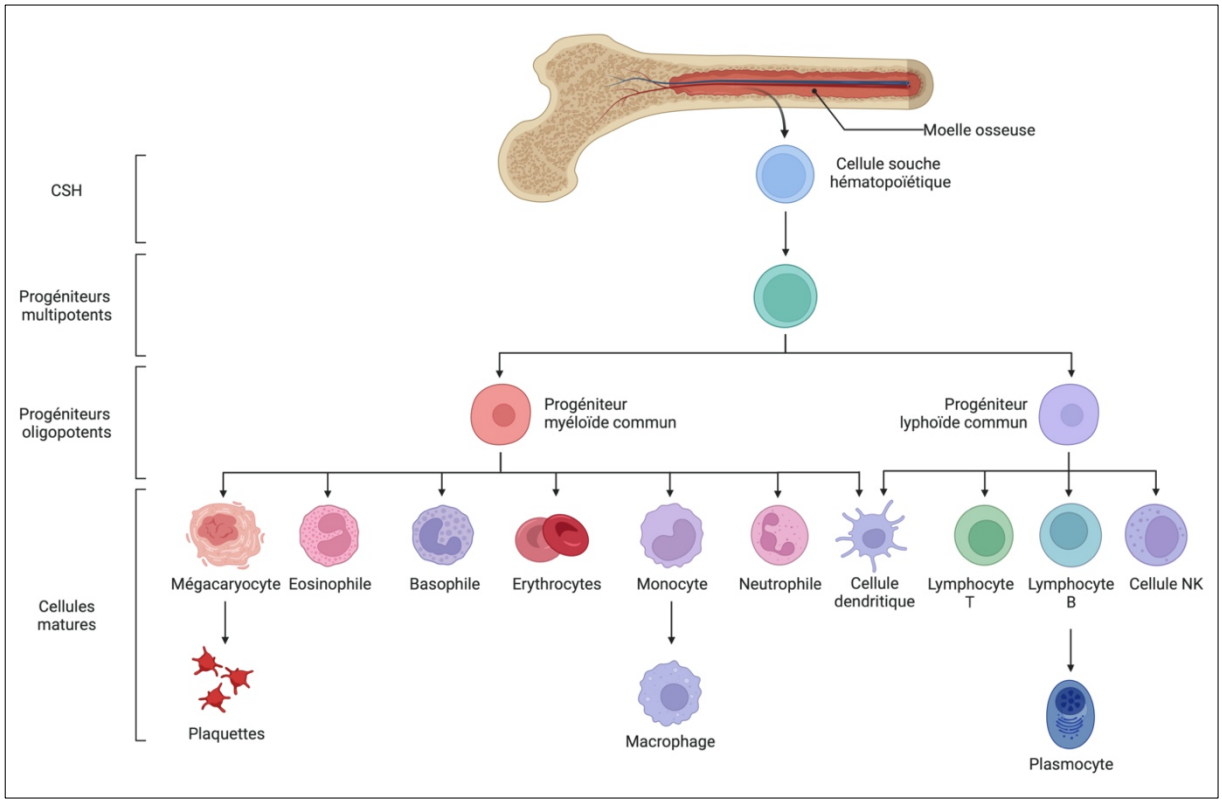


Figure 1 Schéma classique de la hiérarchie hématopoïétique. L'hématopoïèse prend place dans la MO où la CSH, qui possède des capacités d'auto-renouvèlement et de différenciation, va se différencier en progéniteurs multipotents (MPP). Les MPP sont capables de donner naissance aux lignées myéloïde et lymphoïde à partir des progéniteurs myéloïdes communs (PMC) et progéniteurs lymphoïdes communs (PLC). Les PMC se différencient en progéniteurs puis en précurseurs des plaquettes, granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), érythrocytes et monocytes capables de donner des cellules dendritiques et des macrophages tandis que les PLC se différencient en lymphocytes T, B et cellules Natural Killer (NK).

La myélopoïèse est régulée en partie grâce à la fixation de cytokines, définies comme des *Colony Stimulating Factors* (CSF), sur les récepteurs spécifiques de chaque lignée (Metcalf, 1992). En particulier, la signalisation de 3 récepteurs homodimériques de type 1 à l'érythropoïétine (EPO), la thrombopoïétine (TPO) et au *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) contrôlent respectivement l'érythropoïèse, la mégacaryopoïèse, et la granulopoïèse.

La granulopoïèse consiste en la production et la régulation des cellules polymorphonucléaires (PMN) caractérisées par des noyaux polylobées et riches en granules. Avec les monocytes, ce sont les cellules de l'immunité innée qui est la première ligne de défense de l'organisme contre les agents infectieux (Chakravarti, Allaeys, et Poubelle, 2007 ; Nauseef et Borregaard, 2014). Les PMN regroupent les polynucléaires neutrophiles (PNN) qui représentent environ 60% de l'ensemble des globules blancs, les éosinophiles qui en constituent environ 4% et les basophiles à 1% (Blumenreich, 1990). Plusieurs facteurs sont

impliqués dans l'initiation de la granulopoïèse mais le principal est le G-CSF produit majoritairement par les monocytes et les macrophages mais aussi par les cellules endothéliales (Zsebo et al., 1988) et les fibroblastes (Koeffler et al., 1987) . Le G-CSF est responsable de la production de PMN suite à sa fixation sur son récepteur le G-CSFR, (McLemore et al., 2001). La première étape de la granulopoïèse est la formation du myéloblaste caractérisé par un noyau ovale de taille importante et un cytoplasme réduit. Le myéloblaste donne naissance au promyélocyte dans lequel on peut observer la formation des premiers granules cytoplasmiques contenant des cytokines et des enzymes telles que la myélopéroxydase dont le marquage, combiné au rétrécissement du noyau, est utilisé en cytochimie pour identifier les PMN. Le promyélocyte se différencie en myélocyte puis en métamyélocyte qui présente un noyau polylobé. La maturation s'achève avec l'apparition d'un noyau segmenté qui est spécifique d'un PMN mature (Donadieu, Beaupain, et Bellanné-Chantelot, 2008).

L'érythropoïèse est contrôlée par la fixation de l'EPO sur son récepteur EPOR. L'EPO est la première cytokine à avoir été découverte en 1906. C'est à partir des années 60, grâce au développement des techniques de culture en milieu semi-solide, que son rôle dans la production des érythrocytes a été mis en évidence (Bradley et Metcalf, 1966 ; Ichikawa, Pluznik, et Sachs, 1966). Les CSH se différencient en progéniteurs myéloïdes qui génèrent des progéniteurs érythroblastiques puis des proérythroblastes lors de la première étape de production des globules rouges. S'en suit, la formation des érythroblastes basophiles puis polychromatiques au cours de laquelle ces cellules se divisent et accumulent d'importantes quantités de transferrine à leur surface, nécessaire à la formation d'hémoglobine. La division cellulaire s'arrête lorsque les cellules atteignent le stade d'érythroblaste acidophile. Les cellules vont ensuite expulser leur noyau et conserver une protéine structurelle, la réticuline, d'où leur nom de réticulocytes. Les réticulocytes éliminent ensuite leur réticuline ainsi que les molécules d'adhésion responsables de leur rétention dans la MO, pour aller vers le système sanguin où ils terminent leur maturation en globules rouges ou érythrocytes.

La dernière branche de la myélopoïèse est la mégacaryopoïèse donnant naissance aux plaquettes.

II. Mégacaryopoïèse et thrombopoïèse

La mégacaryopoïèse aboutit à la formation des mégacaryocytes (MK) dans la MO à partir desquels vont se libérer les plaquettes dans le sang au cours de la thrombopoïèse.

1. Formation des MK polyploïdes et thrombopoïèse

La mégacaryopoïèse, dans une vue classique, est initiée au niveau de la CSH qui prolifère et se différencie vers des pro-mégacaryoblastes 2n qui sont phénotypiquement identifiés par l'expression de marqueurs caractéristiques de la lignée, tels que l'intégrine αIIIβ ou CD41 et la glycoprotéine Ib ou CD42 (Figure 3). Dans un deuxième temps, ces précurseurs entrent en phase de prolifération puis troquent leur système de mitose contre l'endomitose sans division. Cela permet la génération de MK polyploïdes qui s'accompagne d'une augmentation du volume cellulaire. Les MK ont une ploïdie modale de 16n avec des ploïdies allant de 2n à 64n voire 128n. Au stade terminal de différenciation, ces énormes MK développent des membranes de démarcation et génèrent des granules de sécrétion, les granules denses et alpha. Les granules alpha contiennent de nombreuses protéines tels que le facteur de von Willebrand (vWF) jouant un rôle dans l'adhésion et la coagulation, et des cytokines pro-inflammatoires et pro-fibrosantes comme le *transforming growth factor-beta* (TGF-b). Finalement, on observe la formation de longues extensions cytoplasmiques que l'on nomme les pro-plaquettes et leur fragmentation au niveau des sinus vasculaires médullaires par la force de cisaillement du flux sanguin permet la libération des plaquettes. Ce dernier processus est appelé la thrombopoïèse (Chang et al., 2007 ; Mazzi et al., 2018).

2. Hétérogénéité des MK

La plupart des MK résident dans la MO, mais sont également trouvés dans la rate, le foie ou encore les poumons (Davis et al., 1992). Si l'origine des MK dans la rate et le foie peut être expliquée par la fonction hématopoïétique de ces organes au cours de l'ontogénèse, celle des MK dans les poumons reste encore un sujet de débat. Chez la souris, Il a été montré que les MK pulmonaires sont responsables de la production de la moitié des plaquettes circulantes . En plus d'être plaquettogènes, les MK des poumons présentent un phénotype immunitaire caractérisé par une signature transcriptionnelle proche des cellules dendritiques

présentatrices d'antigènes, notamment avec l'expression du complexe d'histocompatibilité majeur de classe I et II, et combinée soit à une faible ploïdie (Pariser et al., 2021) soit à une ploïdie plus élevée (Yeung et al., 2020) en fonction des études. Ces MK, comme les plaquettes, jouent ainsi un rôle dans la régulation de l'immunité. Plusieurs travaux ont montré que les plaquettes expriment de nombreux récepteurs immunitaires (TLR, récepteurs des immunoglobulines, molécules stimulatrices) (Semple, 2012) permettant de promouvoir l'activation des cellules endothéliales et des leucocytes, ainsi que l'adhésion de ces derniers, le recrutement des neutrophiles, et la détection et l'élimination des agents pathogènes (Clark et al., 2007 ; Kim, Davis, et Jenne, 2018 ; Koupenova et al., 2018). Enfin, une autre étude a mis en évidence l'existence de MK immunitaires dans la MO, ressemblant aux MK pulmonaires, et caractérisés par une faible ploïdie (Sun et al., 2021) et un programme transcriptionnel de type monocytaire. Ces différents travaux mettent donc en évidence l'existence de différents sous-types de MK dont ceux avec un biais plaquettaire et/ou une fonction immunitaire, attestant d'une grande hétérogénéité dans ce type cellulaire.

2. Voies de signalisation régulant la mégacaryopoïèse

La régulation de la production plaquettaire est principalement contrôlée par la TPO et son récepteur TPOR ou *Myeloproliferative Leukemia Protein* MPL (Vainchenker, Besancenot, et Favale, 2013). La TPO est majoritairement produite par le foie. Le taux de TPO plasmatique est régulé par sa clairance qui dépend de la masse plaquettaire (Kuter, Beeler, et Rosenberg, 1994). En effet, MPL est internalisé avec son ligand la TPO par endocytose dans des vésicules de clathrine (Hitchcock et al., 2008). MPL est ensuite ubiquitinylé par CBL grâce à son activité ubiquitine ligase E3 et dégradé par le protéasome (Saur et al., 2010). Le taux de TPO dépend donc de la quantité de MPL en surface liée à la masse plaquettaire ainsi que de la capacité du récepteur à internaliser. Le taux de TPO peut aussi être régulé par d'autres mécanismes que sa clairance, en particulier par régulation de sa synthèse. Par exemple, les plaquettes en vieillissant perdent leur acide sialique et vont alors être reconnues par le récepteur d'Ashwell-Morell à la surface des hépatocytes pour être détruites et stimuler la production de TPO *via* une signalisation impliquant JAK2 (Grozovsky et al., 2015).

MPL est exprimé à la surface des CSH et de toutes les cellules de la lignée mégacaryocytaire (Vigon et al., 1992). MPL joue ainsi un rôle majeur non seulement dans la

mégacaryopoïèse (Kaushansky et al., 1994 ; de Sauvage et al., 1994) mais aussi dans la survie et l'expansion des CSH (Yoshihara et al., 2007). MPL est un récepteur homodimérique de type 1 qui ne possède pas de domaine enzymatique intrinsèque et recrute des tyrosines kinases solubles de la famille des Janus Kinases (JAK2 et TYK2), pour générer une signalisation intracellulaire (Sattler et al., 1995). La fixation de la TPO sur MPL induit un changement de conformation du récepteur qui rapproche les domaines intracellulaires de l'homodimère sur lesquels sont fixées les tyrosines kinases JAK2 et/ou TYK2. Cela entraine une autophosphorylation de ces kinases et la transphorylation du récepteur. Ainsi, JAK2 phosphoryle des résidus tyrosine Y625 et Y630 du domaine intracellulaire de MPL qui servent de sites d'ancrage pour de nombreux substrats aboutissant à l'activation de nombreuses voies de signalisation impliquant les *signal transducers and activators of transcription* (STAT) 1, 3 et 5 (Bacon et al., 1995 ; Miyakawa et al., 1996), la *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) (Geddis, Fox, et Kaushansky, 2001) et la protéine kinase activée par des agents mitogènes (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinases* (ERK) (Rojnuckarin, Drachman, et Kaushansky, 1999) (Figure 2). Les régulateurs négatifs de la signalisation TPO/MPL sont les phosphatases à tyrosine, les *suppressors of cytokine signaling* (SOCS), dont l'expression est induite par les STAT dans une boucle de rétro-contrôle négatif et l'adaptateur LNK qui inhibe la voie JAK2/STAT (Tong et Lodish, 2004). MPL est rapidement ubiquitinylé par CBL, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome (Saur et al., 2010).

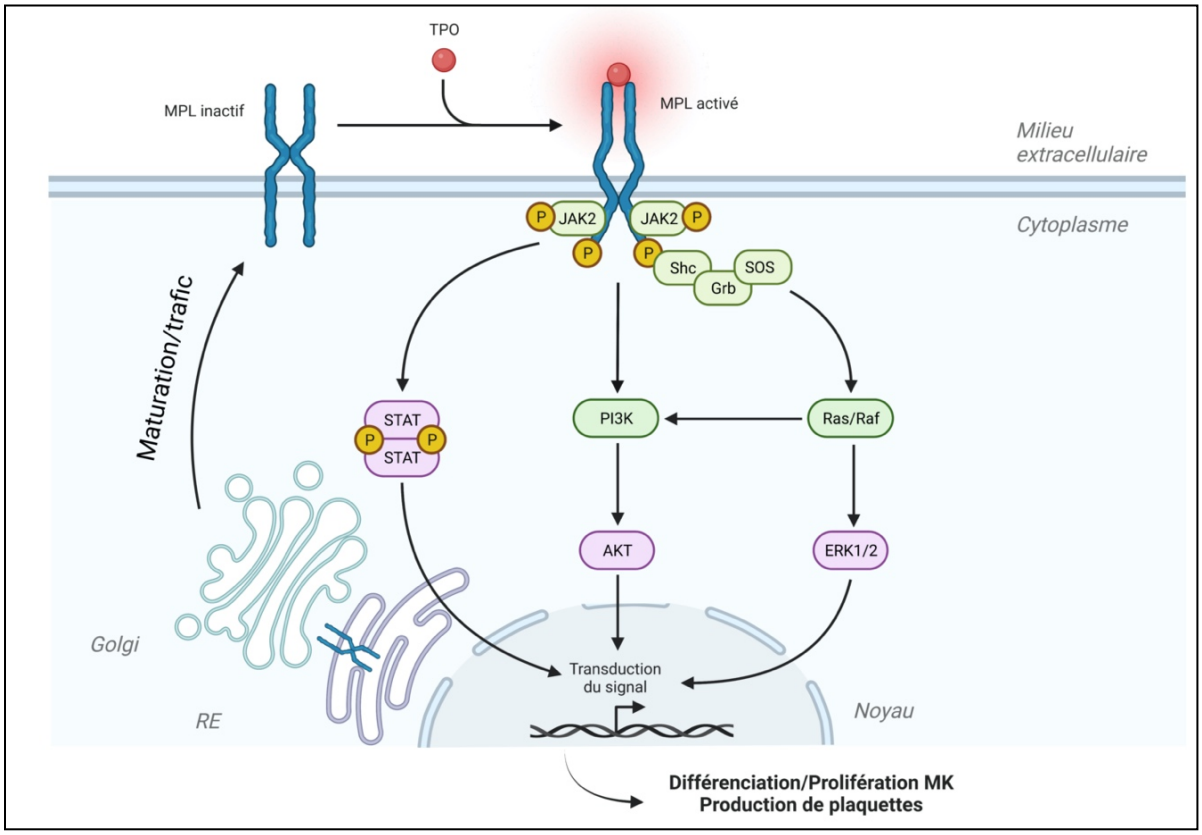


Figure 2 Signalisation induite par la fixation de la TPO sur son récepteur MPL. MPL est maturé dans le RE avant de transloquer à la membrane plasmique *via* le Golgi par la voie canonique. La fixation de la TPO sur MPL induit un changement de conformation du récepteur qui va activer JAK2 et les voies de signalisation en aval, STAT, PI3K/AKT, MAPK/ERK1/2.

La maturation de MPL est dépendante de son interaction avec JAK2 et TYK2 qui jouent le rôle de chaperonnes (Royer et al., 2005), et de son passage dans le réticulum endoplasmique (RE) et dans l'appareil de Golgi où il est N-glycosylé avant son adressage membranaire. Il a également été montré que MPL peut aussi monter à la surface membranaire par la voie non conventionnelle de l'autophagie/sécrétion autolysosomale (Cleyrat et al., 2014).

Le niveau de MPL/JAK2 est très régulé au cours de la mégacaryopoïèse chez l'homme avec une expression faible au niveau CSH et qui augmente lors de la différenciation. Ces niveaux sont corrélés avec des différences de signalisation notamment dans l'augmentation de la voie ERK, mais qui se trouve inactivée en fin de maturation (Besancenot et al., 2010). Les souris *knock-out* (KO) pour le gène de la *Tpo* et les souris *c-mpl*$^{-/-}$ présentent des phénotypes similaires caractérisés par une thrombopénie majeure secondaire à une diminution des MK dans la MO mais également par une diminution importante du nombre de CSH (Murone, Carpenter, et de Sauvage, 1998). Des données chez la souris ont montré que les invalidations de c-*mpl* et de *jak2* à différents stades de la différenciation peuvent avoir des

conséquences très différentes sur le chiffre de plaquettes. Ainsi les KO constitutifs de *mpl* présentent une diminution importante du nombre de CSH et une thrombopénie parfois profonde (Alexander et al., 1996 ; Kimura et al., 1998) alors que les KO conditionnels de *mpl* en fin de différenciation mégacaryocytaire (PF4-Cre) donnent une thrombocytose combinée à des taux de TPO plasmatique élevés (Ng et al., 2014). De manière similaire, les KO conditionnels de *jak2* au niveau des CSH (SCL-CreER^{T}) présentent des cytopénies (Grisouard et al., 2014) alors que les KO conditionnels de *jak2* en fin de différenciation mégacaryocytaire (PF4-Cre) donnent une thrombocytose avec des taux de TPO variables liés à la diminution de MPL à la surface des plaquettes (Eaton et al., 2022)

3. Régulation transcriptionnelle de la mégacaryopoïèse

La mégacaryopoïèse est régulée par un certain nombre de facteurs de transcription pouvant être commun aux lignées mégacaryocytaire et érythroïde, notamment, GATA-1, GATA-2, TAL1/SCL, FOG-1, GFI1b et NF-E2. RUNX1, FLI1 et GABPα sont exclusivement impliqués dans la régulation de la mégacaryopoïèse (Figure 3). Le knockdown chez le poisson zèbre de gènes régulés par certains de ces facteurs de transcription sans fonction connue dans l'hématopoïèse, a montré leur rôle essentiel au développement de la lignée plaquettaire et érythroïde (Lefrançais et al., 2017). De plus, les facteurs de transcription GATA1, RUNX1, FLI1, ETV6, GFI1b ont été retrouvés mutés chez des patients atteints de thrombopénies familiales ce qui leur suggère un rôle dans la mégacaryopoïèse (Antony-Debré et al., 2012 ; Duployez et al., 2019 ; Monteferrario et al., 2014 ; Tubman et al., 2007 ; Zhang et al., 2015).

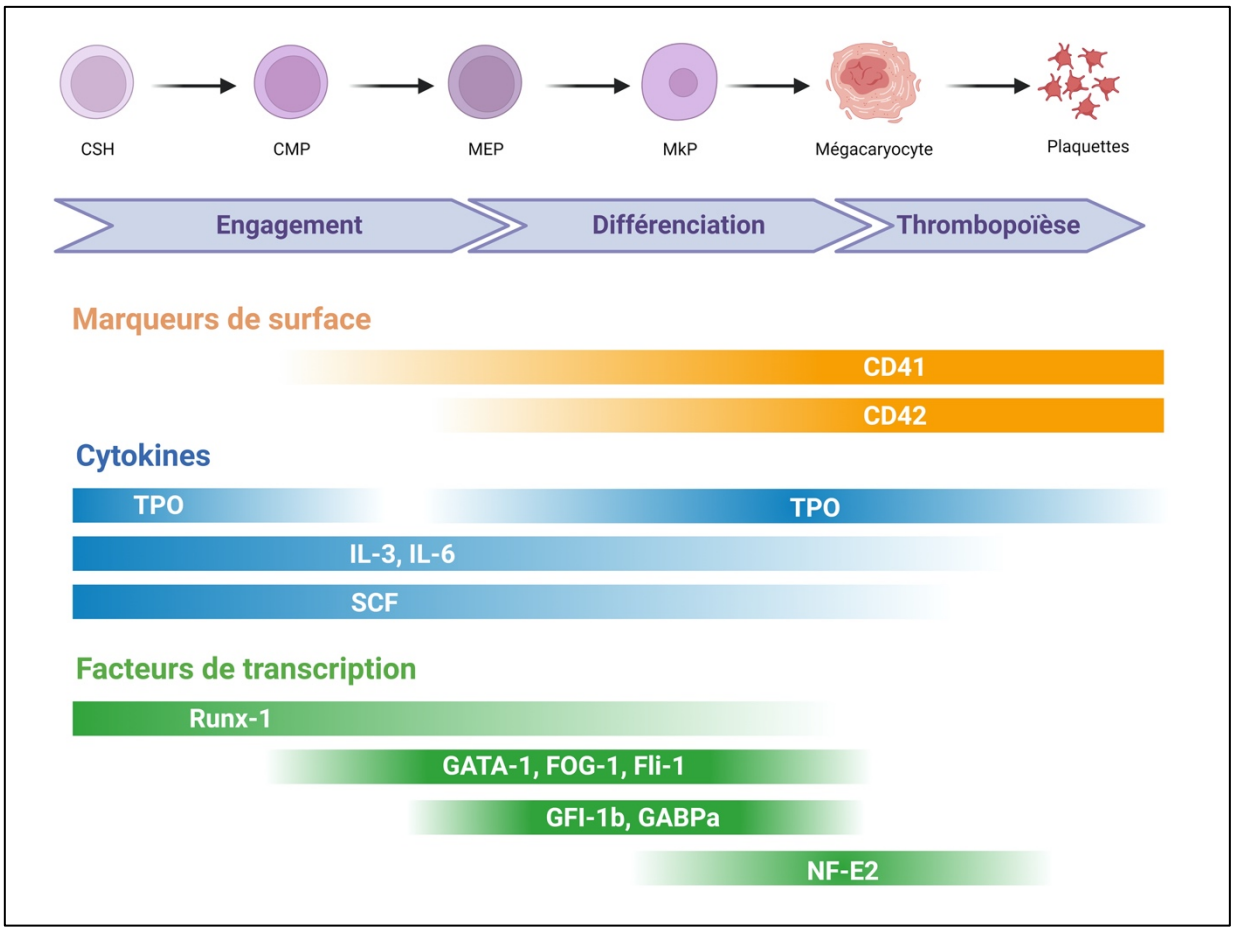


Figure 3 Schéma récapitulatif des différents facteurs et marqueurs de la mégacaryopoïèse (inspiré de Lanza et al, 2018). La cellule souche hématopoïétique (CSH) s'engage vers la voie myéloïde (CMP), se différencie en progéniteur érythro-mégacaryocytaire (MEP), puis en progéniteur mégacaryocytaire (MkP). Au cours de sa polyploïdisation, le MK augmente sa taille et son contenu en ADN ce qui s'accompagne de l'acquisition de l'expression des marqueurs CD41 et CD42. La TPO intervient tout au long de la mégacaryopoïèse. Un contrôle est également exercé par des facteurs de croissance tels que le *stem cell factor* (SCF), l'interleukine-6 (IL-6) et IL-3. La mégacaryopoïèse est également régulée par des facteurs de transcription comme GATA-1, FOG-1, GFI1b, NF-E2, RUNX1, FLI1 et GABPα.

III. Cellules souches hématopoïétiques

Depuis sa création, le modèle de hiérarchie classique de l'hématopoïèse (Figure 1) a été remis en cause, notamment grâce aux nouvelles technologies de pointe et aux analyses de type « omics » qui ont permis de démontrer que bien que les CSH soient organisées hiérarchiquement, le processus de différenciation n'est pas un phénomène par étapes mais forme un continuum depuis les CSH jusqu'aux cellules matures (Buenrostro et al., 2018 ; Dahlin et al., 2018 ; Monteferrario et al., 2014 ; Velten et al., 2017).

Chez la souris, les CSH représentent entre 0,01 % et 0,03 % des cellules nucléées de la MO (Challen et al., 2009) et sont situées dans la niche hématopoïétique qui constitue un environnement favorable et permet de contrôler le maintien de leur état de quiescence, leur différenciation et auto-renouvèlement ainsi que leur apoptose (Domen et Weissman, 1999).

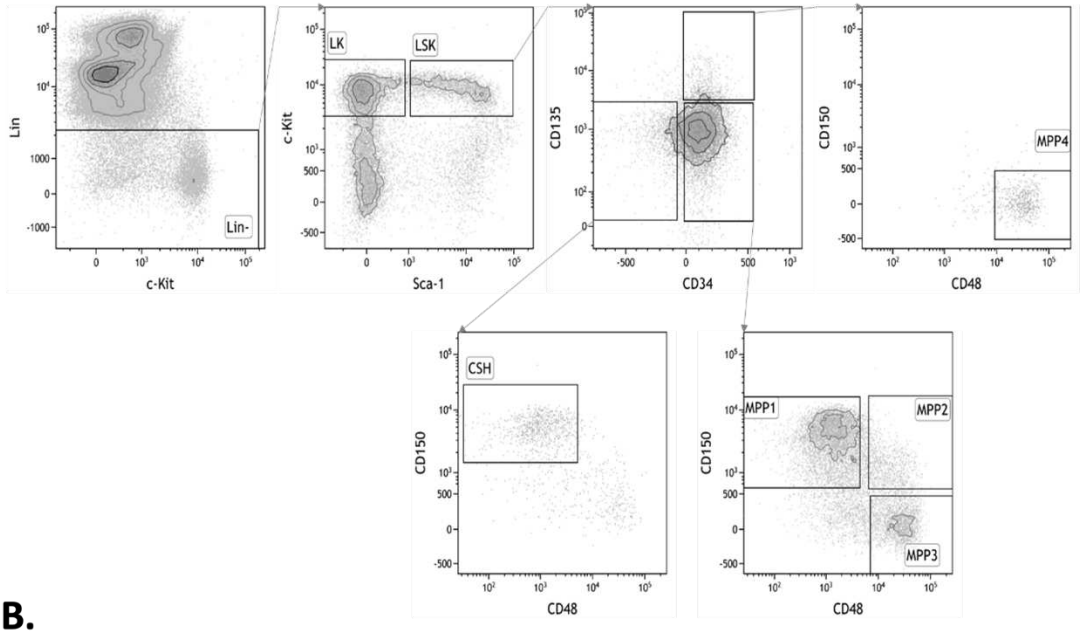
Chez la souris, il existe des marqueurs de surface (voir la partie *Définition phénotypique*) qui permettent d'identifier les CSH par cytométrie en flux et d'isoler environ 5,000 CSH qui ont des propriétés de transplantation à long terme, valeur qui varie en fonction de plusieurs paramètres dont la souche et l'âge de la souris (Challen et al., 2009). Chez l'homme, il est plus compliqué d'accéder aux CSH et donc d'estimer leur nombre dans la MO. Cependant, grâce à des analyses phylogénétiques de mutations acquises au cours de la vie, l'équipe de David Kent et Peter Campbell a réussi à déterminer le nombre approximatif de CSH actives à un instant *t* permettant de générer des leucocytes. Ce nombre est estimé à 50,000-200,000 cellules chez un homme en bonne santé âgé de 59 ans (Lee-Six et al., 2018). Les deux nombres de CSH chez l'homme et la souris ne sont pas réellement comparables car ils définissent deux types différents de CSH ; les CSH actives chez l'homme et les CSH long-terme qui sont plutôt quiescentes chez la souris (Challen et al., 2009).

1. Définition phénotypique

L'identification des CSH humaines est un processus compliqué étant donné la difficulté d'obtenir ces cellules de MO. Cependant, les CSH de souris peuvent facilement être isolées et immunophénotypées par cytométrie en flux à l'aide de marqueurs membranaires. Les CSH sont dépourvues des marqueurs de surface qui caractérisent les cellules matures telles que les lymphocytes B ($B220^+$) et T ($CD3^+$), les granuleux ($Gr\text{-}1^+$) et les monocytes ($CD11b^+$), et les érythrocytes ($Ter\text{-}119^+$). Elles expriment les antigènes Sca-1, c-Kit (LSK) et CD150 ou SLAM mais n'expriment pas CD48. Les marqueurs CD34 et CD135 permettent de discriminer les CSH capables de donner naissance à une hématopoïèse à long-terme (LT) ou à court-terme (ST) (Adolfsson et al., 2001 ; Okada et al., 1992 ; Yang et al., 2005). Ce panel permet également d'identifier les différents types de progéniteurs hématopoïétiques. En effet, au sein des LSK résident également les MPP1-5 qui sont $CD34^+$. Les MPP1 qui sont considérés comme des CSH-ST sont $CD135^-$ $CD150^+$ et $CD48^-$. Les MPP2 ($CD135^-CD150^+CD48^+$) constituent une population hétérogène qui regroupe des progéniteurs multipotents, tandis que les progéniteurs MPP3

(CD135$^-$CD150$^-$CD48$^+$) présentent un biais myéloïde et les MPP4 (CD135$^+$CD150$^-$CD48$^+$) montrent un biais lymphoïde (Figure 4) (Cabezas-Wallscheid et al., 2014).

A.



B.

Cellule	Marqueurs de surface	Références
CSH-LT	Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ Flk2$^-$ CD150$^+$CD48$^-$CD34$^-$	Wilson et al. 2008 Morita, Ema, et Nakauchi 2010 Oguro, Ding, and Morrison 2013 Yamamoto et al. 2013 Yang et al, 2005
CSH-ST ou MPP1	Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ Flk2$^-$ CD150$^+$CD48$^-$CD34$^+$	Akala et al. 2008 Benveniste et al. 2010 Morita, Ema, and Nakauchi 2010 Oguro, Ding, and Morrison 2013 Yamamoto et al. 2013 Yang et al, 2005
MPP2	Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ Flk2$^-$ CD150$^+$CD48$^+$CD34$^+$	Arinobu et al. 2007 Wilson et al. 2008 Oguro, Ding, and Morrison 2013
MPP3	Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ Flk2$^-$CD150$^-$ CD48$^+$CD34$^+$	Arinobu et al. 2007 Wilson et al. 2008 Oguro, Ding, and Morrison 2013
MPP4	Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$ Flk2$^+$CD150$^-$ CD48$^+$CD34$^+$	Arinobu et al. 2007 Wilson et al. 2008 Oguro, Ding, and Morrison 2013

Figure 4 Caractérisation phénotypique des CSH dans la MO par cytométrie en flux (adapté de Pietras et al, 2015). A. Stratégie utilisée en cytométrie de flux pour isoler les CSH (données personnelles). Les CSH n'expriment pas les marqueurs des cellules matures et sont Lin$^-$, c-Kit$^+$ et Sca-1$^+$ (LSK). Dans cette population, on sélectionne les cellules CD34$^-$ et CD135$^-$ où réside la population de CSH-LT qui est CD150$^+$ et CD48$^-$. Dans les LSK, résident également les MPP qui sont CD34$^+$: Les MPP1 ou CSH-ST sont CD135$^-$ CD150$^+$ et CD48$^-$; les MPP2, qui regroupent de progéniteurs multipotents, sont CD135$^-$ CD150$^+$ et CD48$^+$; les MPP3 ou progéniteurs myéloïdes sont CD135$^-$

$CD150^-$ et $CD48^+$ et les MPP4 qui regroupent les progéniteurs lymphoïdes sont $CD135^+$ $CD150^-$ et $CD48^+$. **B.** Tableau référentiel des marqueurs utilisés en cytométrie de flux pour identifier les CSH et les différents types de progéniteurs (MPP).

2. Définition fonctionnelle

Une CSH est caractérisée par ses capacités d'auto-renouvèlement et de différenciation. Il est possible d'identifier les CSH et leurs progéniteurs grâce à des tests clonogéniques. Ces tests reposent sur la mise en évidence rétrospective des progéniteurs hématopoïétiques grâce à leur capacité à former des colonies de cellules matures en milieux semi-solides en présence des facteurs de croissance adaptés. Ces colonies sont appelées CFU pour *Colony Forming Unit* (Figure 5). Selon le milieu et le temps de culture, il est possible de distinguer les différents progéniteurs.

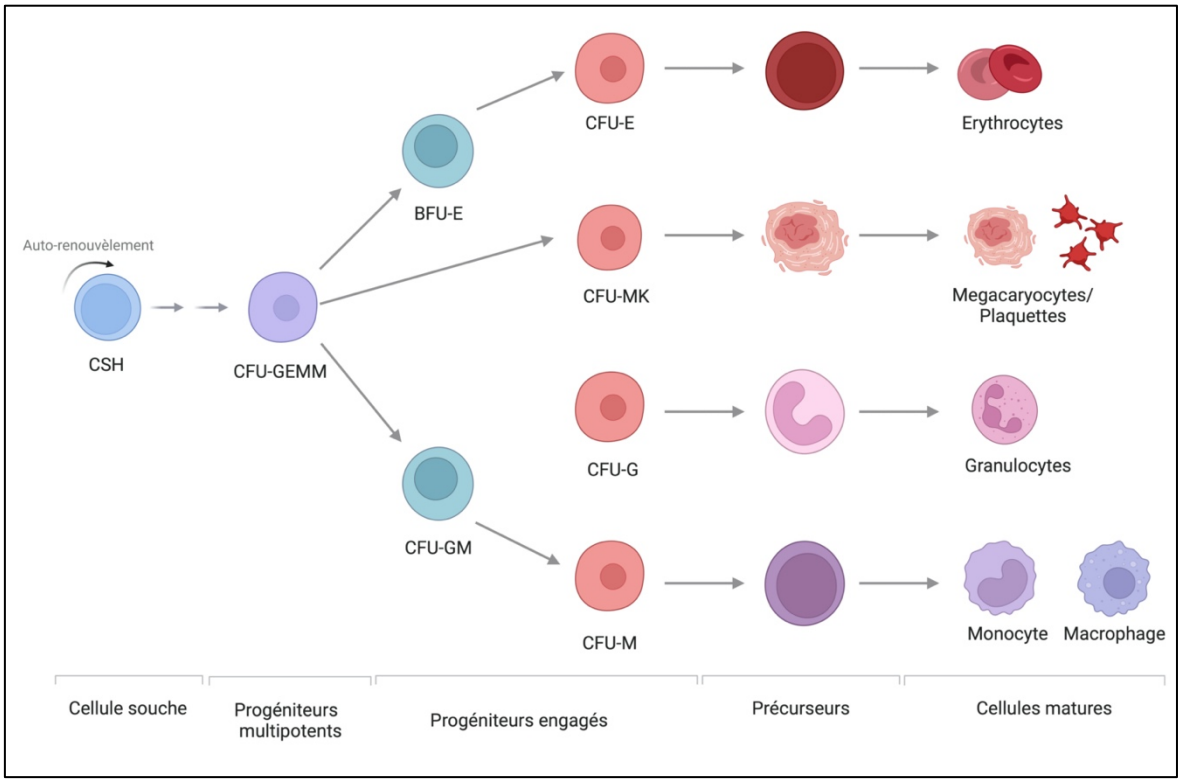


Figure 5 Représentation de la hiérarchie hématopoïétique en milieu semi-solide. La CSH donne naissance aux cellules progénitrices multipotentes ou *colony forming unit granulocyte erythro-megakaryocyte monocyte* (CFU-GEMM) qui vont générer les progéniteurs érythrocytaires ou *burst forming unit–erythrocytes* et *CFU-erythrocytes* (BFU-E, CFU-E). Les CFU-GEMM vont aussi donner des progéniteurs mégacaryocytaires, *CFU-megakaryocyte* (CFU-MK) et des progéniteurs granuleux/monocytaires *CFU-granulocyte monocyte* (CFU-GM).

Le compartiment des CSH a longtemps été considéré comme un compartiment homogène et les cellules partageant les mêmes marqueurs phénotypiques étaient

considérées comme ayant des capacités de différenciation similaires (Manz et al., 2002 ; Notta et al., 2016). Cependant, grâce au développement des analyses à l'échelle unicellulaire de type « omics », il a été montré que chaque CSH possède une signature particulière démontrant l'hétérogénéité des CSH (Copley, Beer, et Eaves, 2012 ; Crisan et Dzierzak, 2016 ; Haas, Trumpp, et Milsom, 2018).

De plus, la transplantation de CSH à l'échelle unicellulaire dans des souris et le suivi de leur hématopoïèse a permis de montrer une diversité fonctionnelle et une hétérogénéité conséquente parmi les CSH-LT. Ces études ont défini plusieurs sous-ensembles de CSH qui présentent un biais de différenciation de lignée myéloïde et lymphoïde. Bien que ces CSH biaisées vers une lignée ou une autre sont capables de générer toutes les lignées hématopoïétiques, les proportions de cellules lymphoïdes et myéloïdes qu'elles produisent diffèrent (Beerman et al., 2010 ; Dykstra et al., 2007 ; Morita, Ema, et Nakauchi, 2010).

Grâce à ce type d'analyse, l'équipe de Jacobsen a pu montrer qu'une sous-population de CSH exprimait fortement le vWF, qui est habituellement stocké dans les granules alpha des MK et des plaquettes et joue un rôle majeur dans la coagulation (Månsson et al., 2007). Au niveau fonctionnel, les études de cette équipe ont démontré l'existence de CSH capables de contourner la voie classique de la mégacaryopoïèse et de générer directement des MK en réponse à des conditions de stress comme la déplétion des plaquettes dans le sang de souris. Des greffes à l'échelle unicellulaire, ont permis d'observer que les souris greffées avec des CSH exprimant le vWF (vWF^+) étaient capables de régénérer toute l'hématopoïèse avec un biais vers la lignée mégacaryocytaire. Les souris greffées avec des CSH n'exprimant pas le vWF (vWF^-) ne repeuplaient pas l'hématopoïèse à long terme et présentaient un biais vers la lignée lymphoïde. Les CSH biaisées vers la lignée mégacaryocytaire résident donc au sommet de l'hématopoïèse (Figure 6) (Sanjuan-Pla et al., 2013). Cette hétérogénéité au niveau des CSH est associée à une hétérogénéité au niveau des niches qui les régulent. Les CSH vWF^+ sont plutôt associées aux MK qui contrôlent leur prolifération et leur quiescence (via la sécrétion de CXCL4 et du TFG beta 1) tandis que les CSH vWF^- sont régulées par les niches artériolaires (Pinho et al., 2018).

Des observations similaires ont été réalisées quant à l'expression de l'intégrine $\alpha IIb\beta$ ou CD41 sur les CSH (Gekas et Graf, 2013). Ces CSH ont été montrées comment étant biaisées vers la lignée érythro-mégacaryocytaire et leur proportion augmente avec l'âge.

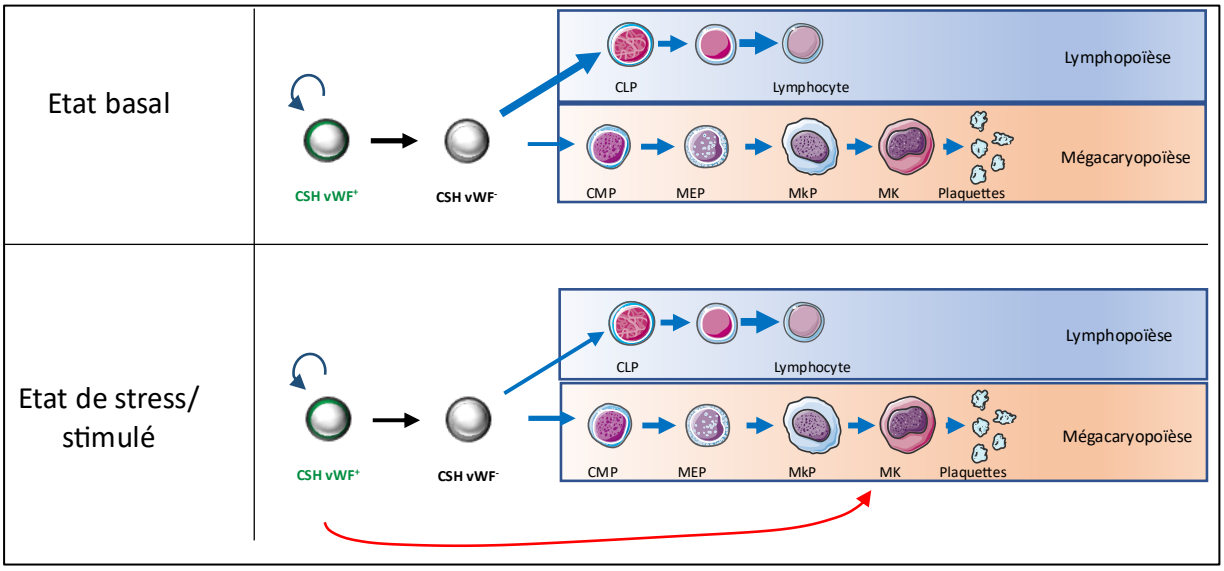


Figure 6 Contournement de la voie classique de la mégacaryopoïèse en condition de stress (Sanjuan-Pla et al, 2013). A l'état basal, la CSH long terme vWF$^+$ donne naissance à la CSH vWF$^-$ qui va générer l'ensemble des lignées de l'hématopoïèse par les étapes intermédiaires de différenciation (avec une préférence lymphocytaire). En conditions de stress, comme une déplétion en plaquettes, la CSH vWF$^+$ est capable de générer directement des MK sans passer par la voie classique.

3. Régulation des CSH

Les destins divers de la CSH sont régulés par deux types de facteurs ; les facteurs intrinsèques et extrinsèques. La CSH-LT est généralement en quiescence, ce qui lui permet de limiter l'accumulation d'erreurs dans l'ADN. Plusieurs études suggèrent également que la CSH, qui réside dans un environnement hypoxique, s'adapte en favorisant le métabolisme du glucose (glycolyse) aux dépens de la phosphorylation oxydative (par les mitochondries) par activation du facteur *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) (Takubo et al., 2010).

- Facteurs extrinsèques

Le passage de l'état quiescent vers un état de prolifération cellulaire se fait en réponse à des facteurs de stress comme les cytokines ou une augmentation du niveau d'oxygène ambiant influençant une ré-activation du métabolisme mitochondrial qui fournit des niveaux d'ATP plus importants que la glycolyse (presque 20 fois plus). Les facteurs extrinsèques qui participent au maintien en quiescence des CSH incluent l'hypoxie ou des cytokines comme le *stem cell factor* (SCF) ou la TPO (Chow et al., 2001 ; Nakamura-Ishizu, Ito, et Suda, 2020). Des expériences ont permis de montrer que la quiescence des CSH pouvait être maintenue *in vitro*

en supplémentant le milieu de culture avec de faibles concentrations de SCF et TPO en conditions hypoxiques (Kobayashi et al., 2019). De plus, le rôle de la signalisation MPL/TPO a été montrée comme étant cruciale pour le maintien des CSH-LT. Les souris KO pour le gène de la *Tpo* et les souris *c-mpl*$^{-/-}$ montrent une diminution du nombre de CSH de plus incapables de reconstituer correctement l'hématopoïèse à long terme de souris irradiées à dose létale (Fox et al., 2002 ; Kimura et al., 1998).

Par ailleurs, il a été montré que la voie de signalisation Tie2/Ang-1 joue un rôle essentiel dans le maintien en quiescence des CSH dans la niche de la MO. Les CSH exprimant le récepteur tyrosine kinase Tie2 possèdent des caractéristiques quiescentes et anti-apoptotiques et adhèrent aux ostéoblastes dans la niche de la MO. L'interaction de Tie2 avec son ligand, l'angiopoïétine-1 (Ang-1), maintient l'activité de reconstitution à long terme des CSH et induit l'adhésion à l'os, ce qui permet la protection du compartiment des CSH du stress myélosuppressif (Arai et al., 2004).

- Facteurs intrinsèques

Au-delà de la réponse aux cytokines, plusieurs paramètres sont impliqués dans l'auto-renouvèlement, la différenciation et la prolifération des CSH incluant les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le calcium, le métabolisme ou encore la réponse au stress du RE. La CSH quiescente possède un faible potentiel de membrane mitochondrial, une augmentation des niveaux d'acides gras et une faible production d'ATP liée à une activité glycolytique élevée due aux conditions hypoxiques de la niche. La production de protéines est maintenue à un niveau minimal (Nakamura-Ishizu, Ito, et Suda, 2020).

Le métabolisme mitochondrial s'accompagne de la production de ROS, qui peuvent aussi être issus de l'exposition à un stress exogène. Au niveau physiologique, les ROS sont des molécules de signalisation qui peuvent réguler plusieurs fonctions cellulaires incluant la prolifération, la différenciation et la mobilisation des CSH. Les CSH-LT sont caractérisées par de faibles niveaux de ROS expliqués par la faible activité métabolique de ces cellules (Carroll et St. Clair, 2018). Certaines pathologies s'accompagnent d'une augmentation des ROS pouvant saturer les défenses anti-oxydantes de la cellule et conduire à l'oxydations d'acide nucléiques, de lipides et protéines avec des conséquences néfastes comme l'inhibition de l'auto-renouvèlement des CSH, leur sénescence, et un épuisement prématuré de ces cellules (Shao et al., 2011).

Les niveaux de calcium dans les CSH quiescentes sont faibles. Des études ont permis de montrer que les cellules progénitrices à capacité lymphoïde étendue (MPP4), présentaient des taux de calcium inférieur à celui des progéniteurs plutôt engagés vers la lignée myéloïde (MPP1-MPP2) reflétant le rôle du calcium dans l'hétérogénéité fonctionnelle des CSH (Luchsinger, 2021).

Le RE est le site cellulaire de synthèse du cholestérol qui joue un rôle majeur dans la régulation du maintien des CSH. Le cholestérol de la cellule peut donc soit être produit dans le RE soit être fourni par l'alimentation et récupéré par des mécanismes d'*uptake* des LDL. Des taux élevés de cholestérol dans la membrane favorise la prolifération et la mobilisation des CSH, et l'hypercholestérolémie est associée à l'expansion des cellules myéloïdes dans le sang périphérique et lie l'hématopoïèse aux maladies cardiovasculaires. Des études chez la souris ont permis de montrer qu'un régime riche en lipides et cholestérol induisait le développement de thrombocytose et lymphocytose reflétant la mobilisation des CSH (Gomes et al., 2010). Le cholestérol est utilisé comme précurseur impliqué dans la biosynthèse des hormones stéroïdes, des oxystérols et des acides biliaires (Russell, 2003). Ces métabolites du cholestérol ont des rôles biologiques importants en tant que transducteurs de signaux et chaperons chimiques impliqués dans l'hématopoïèse physiopathologique (Oguro, 2019).

La réponse au stress du RE joue également un rôle dans l'auto-renouvèlement des CSH. Les causes d'un stress sont principalement l'accumulation de protéines mal-repliées résultant d'une dérégulation de l'homéostasie calcique et/ou de l'état redox de la cellule mais peuvent également être la sécrétion augmentée de protéines. Van Galen *et al.* ont montré que les gènes des voies de l'*Unfolded Protein Response* (UPR), notamment la voie PERK, étaient surexprimés dans les CSH et participaient à leur auto-renouvèlement (van Galen et al., 2014). Une autre équipe a montré que la branche IRE1 était impliquée dans les capacités de repeuplement des CSH de souris et confirment le rôle de la réponse au stress du RE dans l'auto-renouvèlement des CSH (Liu et al., 2019). Cette réponse basale au stress serait un mécanisme qui permettrait de préparer la cellule à sa division (Russell, 2003).

Au cours du vieillissement, des modifications des facteurs extrinsèques (inflammation, ROS, etc…) de concert avec des changements intrinsèques propre à la CSH âgée contribuent à la perte des capacités d'auto-renouvèlement de la CSH et à favoriser la myélopoïèse au détriment de la production de lymphocytes. De façon intéressante, le nombre de MK dans la

MO augmente avec l'âge. Ces MK secrètent le TGF beta 1 (*inflammaging*) qui pourrait être responsable de l'expansion des CSH vWF^+ ayant un biais myéloïde et plaquettaire et qui sont principalement associés aux MK dans la MO. Parmi les mécanismes intrinsèques qui participent au vieillissement de la CSH, l'accumulation de dommages à l'ADN joue un rôle particulièrement important et peut être aléatoire, contribuer au raccourcissement des télomères. Au cours de ce phénomène, il peut y avoir l'acquisition de mutations spécifiques pouvant entrainer une hématopoïèse clonale de signification indéterminée ou CHIP. Certaines de ces mutations qui confèrent un avantage clonal à la CSH peuvent être motrices d'hémopathies malignes, notamment les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP).

Chapitre II Les Néoplasmes Myéloprolifératifs Classiques

I. Définition

Les NMP sont des hémopathies myéloïdes clonales acquises de la CSH caractérisées par la surproduction d'une ou plusieurs lignées myéloïdes. Les NMP « classiques » sont négatifs pour le gène de fusion *BCR-ABL* dont la présence caractérise la leucémie myéloïde chronique (LMC) distinguée par une hyperplasie de la lignée granuleuse dans la MO, la rate, le foie, et dans le sang (Faderl et al., 1999). Les NMP classiques regroupent la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose (MF) primaire (MFP) (Figure 7). La PV est caractérisée par un excès de globules rouges dans le sang, la TE par un excès de production de plaquettes et la MFP par un large excès de MK et de granuleux ainsi que de la présence de fibres de collagène dans la MO responsable de l'aplasie médullaire. La MFP est associée à une hématopoïèse extramédullaire en particulier dans la rate qui peut engendrer une splénomégalie (augmentation du volume de la rate) (Arber et al., 2016a ; Barbui et al., 2018a ; Khoury et al., 2022). L'origine moléculaire des NMP est l'acquisition de mutations affectant les gènes codant pour les protéines JAK2, MPL et calréticuline (CALR).

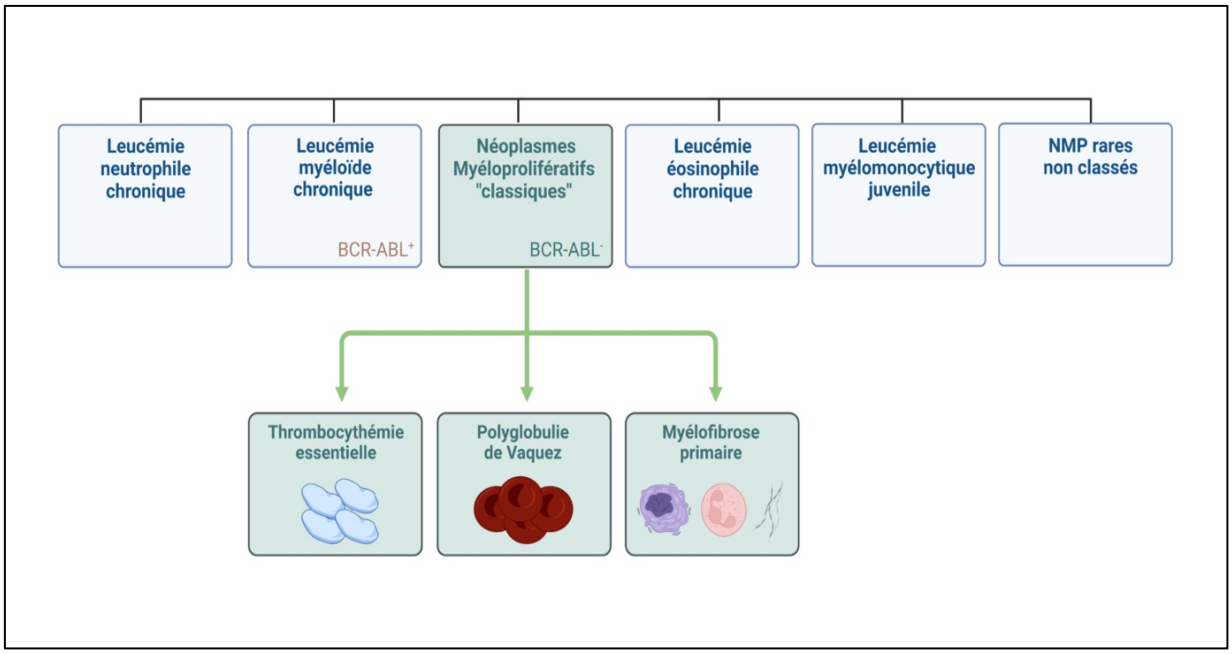


Figure 7 Classification des NMP selon l'OMS. Les NMP regroupent les leucémies à neutrophiles chroniques, les leucémies myéloïdes chroniques caractérisées par la présence du gène de fusion *BCR-ABL*, les NMP classiques négatifs pour *BCR-ABL* et qui regroupent la TE, la PV et la MFP. Les NMP comprennent également les leucémies à éosinophiles chroniques, les leucémies myélomonocytaires juvéniles et d'autres NMP rares non classés.

II. Mutations motrices

Les mutations motrices des gènes codants pour JAK2, MPL et CALR induisent l'activation constitutive des voies de signalisation en aval des récepteurs de l'EPO, la TPO et du G-CSF qui contrôlent les différenciations érythroïde, mégacaryocytaire et granuleuse, respectivement.

1. Mutations du gène codant pour la protéine JAK2

JAK2 est une protéine tyrosine kinase soluble essentielle à la signalisation des récepteurs homodimériques de type 1 ainsi qu'à de multiples autres récepteurs de cytokines impliquées dans la myélopoïèse. JAK2 présente deux domaines homologues dans sa partie C-terminale ; le domaine JH1 (*JAK homologous 1*) portant l'activité kinase et un domaine pseudokinase JH2 catalytiquement inactif, mais qui exerce une régulation négative sur l'activité kinase du domaine JH1 (Saharinen et Silvennoinen, 2002). La partie N-terminale contient le domaine FERM (JH4-JH7) permettant l'interaction de JAK2 avec le domaine cytosolique des récepteurs à l'EPO, la TPO et au G-CSF et un domaine *Src homology 2* SH2 (JH3-JH4) (Yamaoka et al., 2004). Le KO constitutif de JAK2 est létal chez la souris en raison d'un défaut d'érythropoïèse (Neubauer et al., 1998).

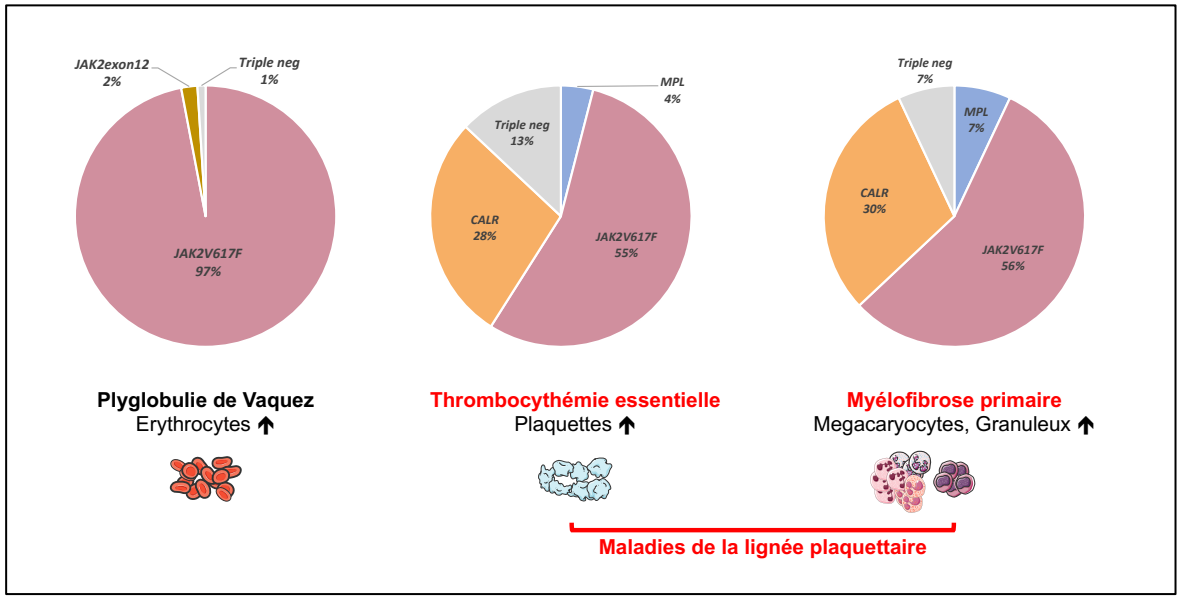


Figure 8 Les mutations motrices dans les NMP. La mutation la plus fréquente est la mutation *JAK2*^{V617F} qui est retrouvée dans la casi totalité des PV et environ 50% de TE et MFP. Les mutations *CALR* sont retrouvées dans environ 30% des TE et MFP. Enfin les mutations *MPL* sont responsables de moins de 10% des TE et MFP.

Dans les NMP, la mutation la plus fréquente, présente dans la quasi-totalité des PV (95%) et environ la moitié des TE et des MFP (Figure 8) est une substitution du nucléotide G en T à la position 1849 de *JAK2* qui entraine le remplacement d'une valine (V) par une phénylalanine (F) au codon 617 (*JAK2*^{V617F}) dans le domaine pseudokinase JH2, levant l'auto-inhibition du domaine kinase ce qui entraine l'activation constitutive de JAK2 et une hypersensibilité voire une indépendance aux cytokines des cellules (James et al., 2005). JAK2^{V617F} interagit et active la signalisation de manière constitutive des récepteurs à l'EPO, la TPO et au G-CSF ce qui explique son association aux 3 maladies (PV, TE et MFP) et le caractère myéloïde hyperprolifératif des NMP.

De plus rares mutations au niveau de l'exon 12 de *JAK2* ont été identifiées chez les patients atteints de PV négatives pour *JAK2*^{V617F} (Pietra et al., 2008 ; Scott et al., 2007). Ces mutations sont des insertions/délétions entre le domaine pseudokinase et le domaine SH2 qui représentent 1-2% des patients atteints de PV et sont plus rarement retrouvées dans les TE et les MF (Williams et al., 2007).

2. Mutations de *MPL*

Comme mentionné ci-dessus, MPL est exprimé à la surface de toutes les cellules de la lignée mégacaryocytaire ainsi que les CSH (Debili et al., 1995). MPL n'a pas d'activité kinase intrinsèque et JAK2 est donc essentielle pour transmettre le signal de la TPO liée à MPL au noyau de la cellule (Ezumi, Takayama, et Okuma, 1995 ; Morita et al., 1996 ; Sattler et al., 1995).

Certaines TE et MF peuvent être dues à l'acquisition de mutations activatrices dans le gène codant pour MPL. La mutation la plus fréquente affecte le tryptophane (W) 515 (W515L/K) situé dans le motif amphipathique à la jonction transmembranaire-cytoplasmique impliqué dans la prévention de l'auto-activation du récepteur (Pikman et al., 2006). D'autres mutants plus rares dans les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire (S204P, S505N, Y591N/D) ont été trouvés chez les patients NMP. Tous ces mutants induisent un changement conformationnel de MPL conduisant à la juxtaposition des deux JAK2 qui lui sont associées et à l'activation constitutive de la signalisation MPL/JAK2, démontrée par des études dans des lignées cellulaires (Staerk et al., 2006).

3. Mutations de la calréticuline

En 2013 ont été découvertes des mutations au niveau du gène *CALR* (Klampfl et al., 2013 ; Nangalia et al., 2013). Ce sont des mutations récurrentes (plus de 50 différentes) dans le dernier exon (exon 9) du gène dans 25%-30% des patients ayant une TE ou une MFP et de manière mutuellement exclusive de celles affectant *MPL* ou *JAK2*. Les deux mutations les plus fréquentes trouvées dans environ 80% des cas de mutations *CALR* chez les patients sont une délétion de 52 paires de base (*del52*) ou « type 1 » et une insertion de 5 paires de bases (*ins5*) ou « type 2 » qui diffèrent essentiellement par la taille de la séquence normale résiduelle codée par l'exon 9. Les autres mutations sont donc très rares et ont été classées par analogie structurale en « *type 1-like* » et « *type 2-like* ». Le rôle physiologique et les conséquences des mutations *CALR* dans les NMP seront discutés en détails dans le chapitre III La calréticuline.

III. Mutations additionnelles/associées

De nombreuses mutations dans des gènes impliqués dans la régulation de l'épigénétique (*TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), de l'épissage (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*) et de la transcription (*TP53*, *RUNX1*) ont été identifiées chez les patients NMP. La présence de ces mutations seules n'entraine pas de phénotype de NMP. Elles peuvent être acquises avant ou après les mutations motrices et modifient l'avantage clonal et/ou accélèrent la progression des NMP vers la MF, ce qui en fait une maladie beaucoup plus hétérogène que la TE ou la PV, ou leur transformation en leucémie aiguë myéloïde (LAM). Chez les patients mutés *CALR*, les mutations additionnelles sont préférentiellement acquises après la mutation *CALR*. De plus, les mutations de l'épissage sont beaucoup moins associées aux mutations *CALR* qu'à *JAK2*^{V617F}.

Ces mutations seront plus amplement détaillées dans la partie 4.4 de la revue « *Lessons from MPN mouse models* » intégrée à la suite de l'introduction. Cette partie traitera de l'utilisation des modèles de souris pour étudier le rôle des mutations additionnelles dans les NMP et l'amplification du clone malin.

IV. Comparaison des NMP mutés *JAK2*^{V617F} *vs. CALR vs. MPL*

Le taux d'incidence standardisé des NMP sur la population mondiale est de 1,4 pour 100 000 chez la femme et 1,8 pour 100 000 chez l'homme. L'âge médian de diagnostic de ces

pathologies est de 66 ans (Heppner et al., 2019). L'identité de la mutation motrice à l'origine du NMP a un effet sur les caractéristiques cliniques des patients.

Tableau 1 Comparaison des TE mutées *JAK2*V617F, *CALRdel52* et *CALRins5*

VAF pour fréquence allélique.

TE	*JAK2*^{V617F}	*CALR*^{DEL52}	*CALR*^{INS5}
Plaquettes	+	++	+++
Leucocytes	++	+	+
Thromboses	++	+	+
Progression en MF	++	+	+/-
Évolution en LAM	++	+/- (homozygote)	+
VAF « CSH/Progéniteur »	5-30%	50-100%	50-100%

L'âge médian au diagnostic de la MF chez les patients est d'environ 65 ans chez les patients portant une mutation *JAK2*^{V617F}, de *MPL* ou *CALR* type 2 alors qu'il est de 55 ans pour les patients portant une mutation *CALR* type 1 (Tefferi et al., 2018). Les taux de plaquettes sont plus hauts dans les TE mutées *CALR* que celles JAK2^{V617F} et il a été montré que la thrombocytose est légèrement plus élevée en présence de *CALRins5* que de *CALRdel52* (Pietra et al., 2016). JAK2^{V617F} induit une leucocytose plus élevée que les mutants CALR ce qui pourrait expliquer la différence dans le risque de thromboses plus élevé avec *JAK2*^{V617F}. Les patients mutés *CALR* ont aussi une incidence plus élevée d'hémorragie induite par l'aspirine ce qui révèle un défaut d'hémostase (Prins et al., 2018). Les patients TE porteurs d'une mutation *CALR* de type 1 sont plus susceptibles d'évoluer vers une MF secondaire que ceux ayant une mutation *JAK2*^{V617F} ou *CALR* de type 2 (Pietra et al., 2016). De plus, les MF *JAK2*^{V617F} ou mutées *MPL* sont de moins bon pronostic que celles mutées *CALR,* en termes de survie et de transformation en LAM (How, Hobbs, et Mullally, 2019). Les NMP *CALRdel52* qui se transforment sont souvent homozygotes alors que l'homozygotie semble plus fréquente chez les patients *CALRins5* que ceux *CALRdel52* au stade TE (El-Khoury et al., 2020a). Enfin, au diagnostic dans les compartiments souche et progéniteur, la charge allélique est beaucoup plus élevée pour les mutations de *CALR* que de *JAK2*^{V617F}. De plus, alors que la mutation

JAK2^{V617F} donnent un fort avantage lors de la différenciation myéloïde, ce n'est pas le cas des mutations *CALR* pour lesquelles les charges alléliques restent stables dans les CSPH et les cellules du sang (Dupont et al., 2007 ; El-Khoury et al., 2020b)

V. Symptômes/Critères de diagnostic

Les NMP classiques sont des maladies évolutives et forment un continuum plutôt que trois maladies distinctes. Ces évolutions sont dépendantes de la mutation à l'origine de la maladie. La TE *JAK2*^{V617F} peut évoluer en PV qui peut elle-même évoluer vers la MF selon le niveau d'activité kinase JAK2^{V617F}, hétérozygote dans les TE et qui passe à l'état homozygote dans les PV par recombinaison mitotique et enfin avec une amplification du clone homozygote dans les MF. Les TE mutées *MPL* ou *CALR*, et plus fréquemment les types 1 que les types 2, peuvent évoluer en MF. Les critères de diagnostic des NMP ont été mis à jour en 2016 par l'organisation mondiale de la santé (Arber et al., 2016b ; Barbui et al., 2018b).

La MF est la forme la plus sévère des NMP classiques avec le plus mauvais pronostic. La MF est caractérisée par une hyperplasie mégacaryocytaire accompagnée du développement de fibres de collagène dans la MO auquel on attribue un grade de 1 à 3 et qui aboutit à une hématopoïèse extramédullaire dans la rate conduisant à une splénomégalie (Abdel-Wahab et Levine, 2009 ; Tonkin et al., 2012). La présence de ces fibres de collagène empêche le bon fonctionnement de la MO et engendre une anémie pouvant aller jusqu'à une cytopénie. Les MF présentent en général une ou plusieurs mutations associées comme celles affectant *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2* et *SF3B1*. Selon le grade de la MF, différents groupes peuvent être mis en évidence dont la médiane de survie peut varier de 2 à 11 ans (Cervantes et al., 2009), suivant également le risque augmenté de transformation en LAM (Geyer et Mesa, 2014).

La PV représente 45% des cas de NMP classiques (Rollison et al., 2008). Environ 15% des patients atteints de PV évoluent vers une MF secondaire et 5% vers une LAM (Passamonti et al., 2011). Elle est caractérisée par une augmentation du nombre et du volume de globules rouges, de l'hémoglobine et de l'hématocrite (Tonkin et al., 2012). Dans certains cas, il est possible d'observer une augmentation du nombre de globules blancs, une thrombocytose ainsi qu'une splénomégalie (Arber et al., 2016b ; Finazzi et al., 2007). L'aggravation de l'hyperviscosité du sang augmente le risque de thrombose et contribue à la diminution de la médiane de survie des patients qui varie entre 15 et 20 ans (Tefferi et al., 2013).

La TE est caractérisée par un taux de plaquettes supérieur à 450 x 10^9/L dans le sang, une hyperplasie mégacaryocytaire dans la MO et très rarement une augmentation mineure (grade 1) des fibres de réticuline (Arber et al., 2016b ; Tefferi et Barbui, 2015). La thrombocytose participe à augmenter le risque d'hémorragies et de thromboses. Cependant son pronostic est meilleur que celui de la PV avec une médiane de survie qui est entre 18 et 20 ans (Wolanskyj et al., 2006).

Ce classement est bien entendu complété par la détection des mutations motrices chez les patients.

V. Traitements

Dans les PV et TE, plusieurs traitements sont utilisés dans le but de réduire le risque de thrombose. La phlébotomie ou saignée est utilisée comme traitement de première ligne dans la PV afin de réduire le nombre de globules rouges dans le sang. L'aspirine est utilisée comme agent anti-agrégant plaquettaire dans les TE et PV mutées *JAK2 (Tonkin et al., 2012)*.

L'hydroxyurée (HU) est un agent oral souvent recommandé comme traitement cytoréducteur de première ligne chez les patients atteints de PV et de TE pour contrôler la splénomégalie et la thrombocytose chez les patients atteints de MF précoce. L'HU ralentit la division cellulaire et donc diminue le nombre de cellules sanguines produites par la MO (Fowlkes et al., 2018). Certains patients intolérants à l'HU sont éventuellement traités par le busulfan qui est un agent alkylant qui interfère avec la production de cellules sanguines (Tefferi et Barbui, 2015).

L'anagrélide est un médicament qui permet de réduire le nombre de plaquettes en inhibant la formation de colonies mégacaryocytaires ce qui permet de réduire le risque de thrombose et d'hémorragie (Birgegård, 2016).

Le ruxolitinib est un inhibiteur de JAK1 et 2 utilisée dans les PV de haut risque ou intolérantes à l'HU et dans les MF. Il permet de réduire le volume de la rate, de soulager les symptômes constitutionnels, d'améliorer la qualité de vie et stabiliser la fibrose. Sa découverte a permis d'augmenter l'espérance de vie des patients (Fowlkes et al., 2018).

Enfin, l'interféron α (IFNα) est utilisé dans les PV ou les TE et permet de contrôler les paramètres hématologiques et d'entraîner la réduction de la charge allélique du clone *JAK2*^{V617F} non seulement dans les cellules sanguines mais également dans les CSH (Kiladjian

et al., 2008 ; Mosca et al., 2021). Bien qu'il induise des réponses hématologiques dans 70-80% des patients mutés *JAK2* ou *CALR*, l'IFNα induit une réponse moléculaire dans 50% des patients *JAK2*^{V617F} avec des rémissions complètes dans 20% des cas parfois même après l'arrêt du traitement. En revanche, l'effet moléculaire de ce traitement a été montré comme moins efficace chez les patients portant des mutations *CALR* (Czech et al., 2019 ; Mosca et al., 2021). Il s'agit d'un traitement de deuxième ligne car il provoque d'importants effets secondaires tels que la myélosuppression, infections, symptômes grippaux, dépression, diarrhée, trouble de la vision et asthénie (Sirhan et al., 2015). Ce traitement n'est pas utilisé dans les cas de MF hormis celles qui présentent des composantes prolifératives car il amplifie la cytopénie due à l'aplasie médullaire.

A ce jour, le seul traitement curatif pour les patients atteints de MF est l'allogreffe de MO mais peu de cas sont éligibles du fait de l'âge avancé de la majorité des patients. La transfusion sanguine est également recommandée dans les cas de pancytopénie conséquente à l'aplasie médullaire.

Actuellement, il n'existe pas de traitement capable de cibler efficacement les cellules *CALR* ou *MPL* mutées. La compréhension de l'impact de ces mutants sur le développement des NMP est donc fondamentale pour la mise en place d'une thérapie.

I. Rôle physiologique de la CALR

1. Structure de la CALR

La CALR est une protéine chaperonne du RE de 46 kDa, constituée de 417 acides aminés hautement conservés entre les espèces. Il existe 70% d'homologie entre l'humain et la souris. La protéine CALR est composée de trois domaines (Figure 9) (Smith et Koch, 1989) :

Le domaine globulaire en N-terminal possède un site de liaison au zinc. Le domaine P central est riche en proline (P) et forme, avec le domaine N, l'activité lectine ou chaperonne liant les résidus N-glycosylés des protéines nouvellement synthétisées. Le domaine P lie l'enzyme disulfure oxydoréductase ERp57 qui catalyse la formation des ponts disulfures entre les cystéines des protéines néo-synthétisées pour aider à leur repliement. Ce domaine possède une forte affinité mais faible capacité de liaison des ions calcium. Le domaine C contient de nombreux motifs chargés négativement et est impliqué dans la fixation du calcium grâce à sa haute capacité mais faible affinité permettant son stockage dans le RE et la régulation de l'homéostasie calcique. Par ailleurs, la CALR possède une séquence Lysine-Aspartate-Glutamate-Leucine (KDEL) en position C-terminale qui permet sa rétention dans le RE, ainsi qu'un peptide signal clivable de 17 acides aminés en N-terminal pour son adressage dans le RE (Lu, Weng, et Lee, 2015 ; Migliaccio et Uversky, 2018).

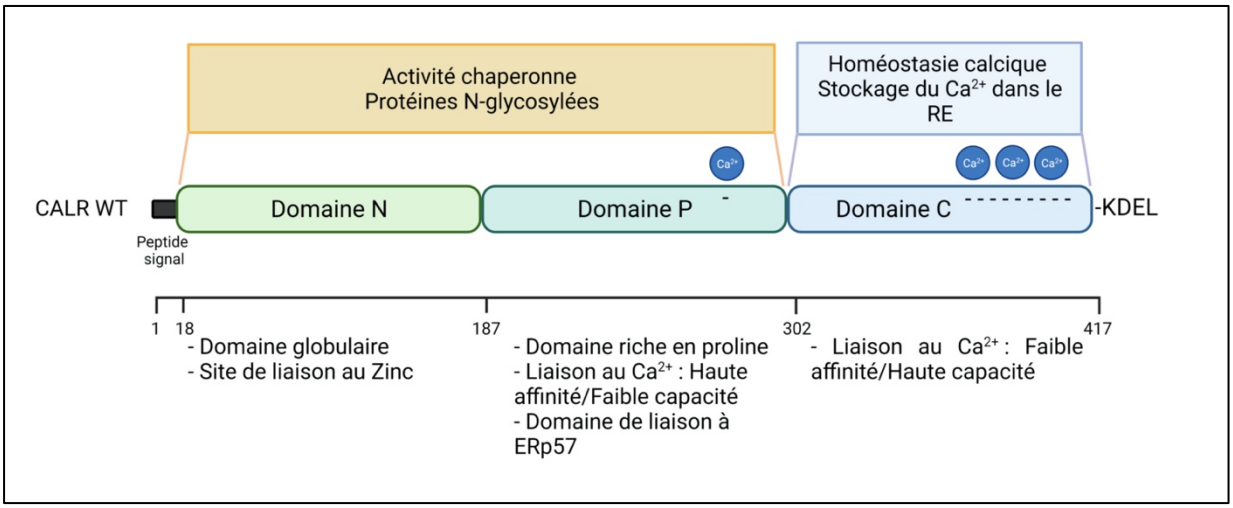


Figure 9 Structure de la CALR et fonctions de ses domaines. La protéine contient trois domaines fonctionnels : Les domaines N et P impliqués dans l'activité chaperonne et un domaine C impliqué dans l'homéostasie calcique. La protéine contient une séquence signal en N-terminal et un motif de rétention dans le RE en C-terminal. Les fonctions des 3 domaines sont indiqués en dessous de ceux –ci.

2. Repliement des protéines membranaires et de sécrétion

Les protéines destinées à la sécrétion et à la membrane, ainsi que celles résidentes du RE (comme la CALR) et des organites de la voie sécrétrice, sont adressées au RE pour leur maturation grâce à leur peptide signal. Elles entrent dans le RE par un processus co-traductionnel pour y subir diverses modifications commençant par le clivage du peptide signal, et pouvant inclure la formation de ponts disulfures, l'ADP-ribosylation, l'addition d'ancres glycosylphosphatidylinositol, la N-glycosylation (attachement d'une chaine oligosaccharidique sur l'azote (N) du groupement amide d'une asparagine d'un site consensus) nécessaires pour leur repliement correct et ainsi leur fonction biologique. Au cours des différentes étapes de maturation dans le RE puis le Golgi, l'état de ces modifications signale leur état de maturité, permettant aux systèmes de contrôle qualité de juger si elles peuvent poursuivre leur route vers leur destination finale ou doivent être dégradées (Ruggiano, Foresti, et Carvalho, 2014). Ces contrôles sont médiés par des chaperonnes moléculaires qui assistent les protéines néo-synthétisées dans leur maturation (Ellis et van der Vies, 1991).

i. Les chaperonnes ou lectines liant les motifs N-glycosylés

La N-glycosylation est un processus biochimique ayant lieu dans le RE qui aboutit à la fixation d'une arborescence de 14 sucres dont 3 glucoses, 9 mannoses et 2 N-acétylglucosamines ($Glc_3Man_9GlcNAc_2$) sur certaines asparagines de chaînes peptidiques en croissance dès leur entrée dans la lumière du RE. La N-glycosylation permet de protéger la protéine nouvellement synthétisée de la dégradation, participe à son repliement et permet d'augmenter son hydrophilie (Culyba et al., 2011 ; Hanson et al., 2009).

La CALR et la calnexine (CNX) sont des lectines reconnaissant les sites de N-glycosylation des protéines nouvellement synthétisées. Contrairement à la CALR qui est soluble dans la lumière du RE, la CNX est une protéine de 67 kDa transmembranaire résidente du RE. Elle est constituée d'un grand domaine luminal N-terminal de liaison au calcium, d'une seule hélice transmembranaire et d'une courte queue cytoplasmique acide (90 résidus). La CNX est une chaperonne qui participe au repliement et au contrôle qualité des protéines N-glycosylées en collaboration avec la CALR.

Dès l'entrée de la protéine dans le RE, l'oligosaccharide $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ est attaché sur les résidus asparagine de sites consensus par les dolichols (Kornfeld et Kornfeld, [s.d.]). Les glucosidases I et II vont ensuite prendre le relai en éliminant deux résidus de glucoses à partir des glycanes N-liés. La CALR et la CNX reconnaissent la protéine monoglucosylée et l'accompagnent dans sa maturation. Cette interaction est stabilisée par ERp57 qui interagit avec le domaine P de la CALR et de la CNX. L'élimination du glucose restant par la glucosidase II libère la protéine de CALR/CNX et permet son transport hors du RE vers le Golgi. Si la protéine est mal repliée, elle est maintenue dans le cycle CALR/CNX et prise en charge par l'enzyme *UDP-glucose : glycoprotein glucosyltransferase* (UGGT) pour être à nouveau glycosylée jusqu'à obtenir une conformation correcte (Ellgaard et Frickel, 2003). Si l'interaction avec la CALR/CNX persiste, la protéine est définie comme non conforme et envoyée vers la voie de dégradation associée au RE (ERAD) (Figure 10). Elles sont ciblées vers le rétrotranslocon pour être déplacées du RE vers le cytosol et dégradées par le système ubiquitine-protéasome (Hegde, 2010). Malgré les fonctions redondantes de la CALR et de la CNX, elles ont chacune des substrats spécifiques. Par exemple, CALR est exclusivement impliquée dans le repliement de plusieurs protéines comme la myélopéroxydase (Nauseef, McCormick, et Clark, 1995), la protéine protéolipidique de la myéline (Gudz et al., 2002) ou la chaîne α de l'intégrine (Kwon et al., 2000).

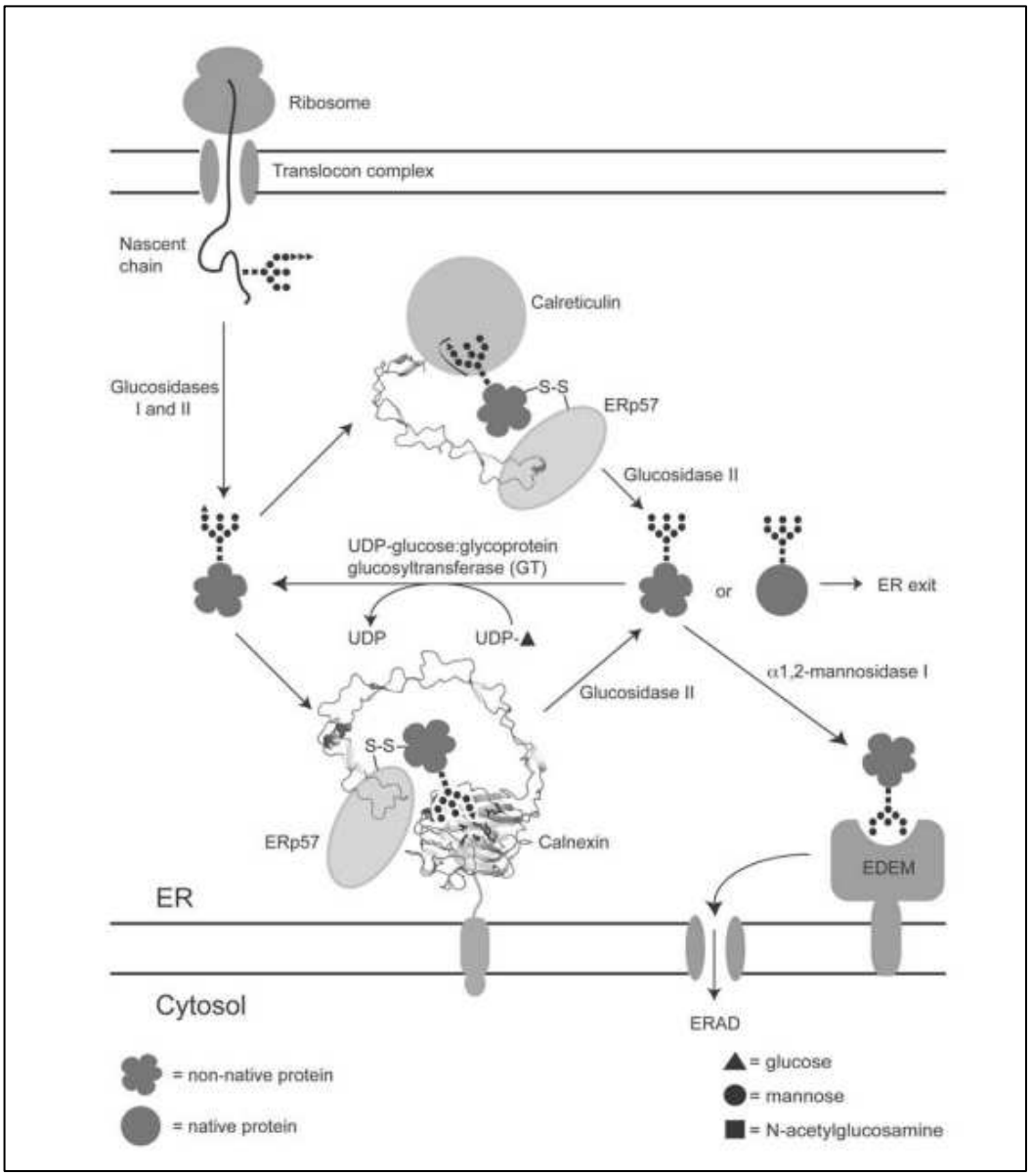


Figure 10 Cycle CALR/CNX (Ellgaard et Frickel, 2003). Les glucosidases I et II éliminent deux résidus de glucose de l'oligosaccharide $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ de la protéine né-osynthétisée. CALR et CNX lient la protéine via leur domaine lectine et l'accompagnent dans sa maturation. Cette interaction est stabilisée par ERp57 qui interagit avec le domaine P de la CALR et de la CNX. L'élimination du glucose restant par la glucosidase II libère la protéine de la CALR/CNX et permet son transport hors du RE vers le Golgi où elle poursuit sa glycosylation et sa maturation. Une protéine mal repliée est maintenue dans le cycle CALR/CNX et est prise en charge par l'enzyme UGGT pour être à nouveau glycosylée jusqu'à obtenir une conformation correcte. Si l'interaction avec la CALR/CNX persiste, la protéine est définie comme non conforme et envoyée vers la voie de dégradation associée au RE (ERAD).

ii. La voie de réponse UPR au stress du RE

Quand le système des chaperonnes est dépassé, des protéines mal repliées peuvent s'accumuler dans le RE et induire un stress. Pour contrer ou s'adapter à ce stress, la cellule

déclenche alors la réponse *unfolded protein response* (UPR) afin de rétablir un équilibre entre les protéines mal repliées et les chaperonnes. En cas de stress chronique, l'induction de facteurs de transcription tels que CHOP sont responsables de l'apoptose de la cellule.

L'*immunoglobulin binding protein* (BiP) est essentielle à la détection du stress du RE et à l'activation de l'UPR. BiP, ou *Glucose Related Protein of 78 kDa* (GRP78) ou *Heat Shock 70 kDa Protein 5* (HSPA5), assiste le repliement de protéines en agissant comme une foldase et prévient leur agrégation comme une holdase (Cook et Clarke, 2012). BiP interagit avec les domaines hydrophobes exposés à la surface des protéines néo-synthétisées, domaines masqués au cœur de la protéine si celle-ci à une conformation correcte. En cas de problème, BiP se dissocie des trois senseurs transmembranaires de l'UPR, entrainant ainsi l'activation de : l'*activating transcription factor 6* (ATF6), l'*inositol requiring kinase 1* (IRE1) et *double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase* (PERK) (Figure 11) (Oakes et Papa, 2015 ; Schröder et Kaufman, 2005). BiP est également une cible de l'UPR puisque son expression est régulée par les trois voies de l'UPR (Chapman, Sidrauski, et Walter, 1998 ; Korennykh et Walter, 2012 ; Okamura et al., 2000 ; Yoshida et al., 2001).

- Voie ATF6 : ATF6 est un facteur de transcription transmembranaire du RE. Lorsque ATF6 et BiP se dissocient, ATF6 transloque du RE au Golgi où il est clivé par S1P et S2P, libérant son domaine cytosolique N-terminal qui migre vers le noyau pour initier la transcription de ses gènes cibles (Kadowaki et Nishitoh, 2013).
- Voie IRE1 : L'activation de l'activité endoribonucléase (RNase) de IRE1 induit l'épissage de l'ARN messager XBP1 au niveau du cytosol qui va être traduit puis transloque dans le noyau pour activer la transcription de protéines chaperonnes mais aussi des composants de la voie ERAD qui permet la dégradation des protéines mal repliées par le protéasome (Kadowaki et Nishitoh, 2013).
- Voie PERK : PERK inhibe le facteur d'initiation de la traduction eIF2α en le phosphorylant dans le cytosol. Cela conduit à une diminution globale du processus de traduction des protéines afin d'éviter de surcharger les chaperonnes prenant en charge les protéines mal repliées (Harding, Zhang, et Ron, 1999). La forme phosphorylée de eIF2α active le facteur de transcription ATF4 qui migre dans le noyau et active la transcription de chaperonnes et du facteur pro-apoptotique CHOP en cas de stress chronique. En parallèle l'activation de PERK peut induire une activation de la voie antioxydante NRF2 en libérant la protéine de KEAP1.

Si l'ensemble de ces réponses ne suffit pas à résoudre les causes du stress du RE, la cellule rentre en apoptose.

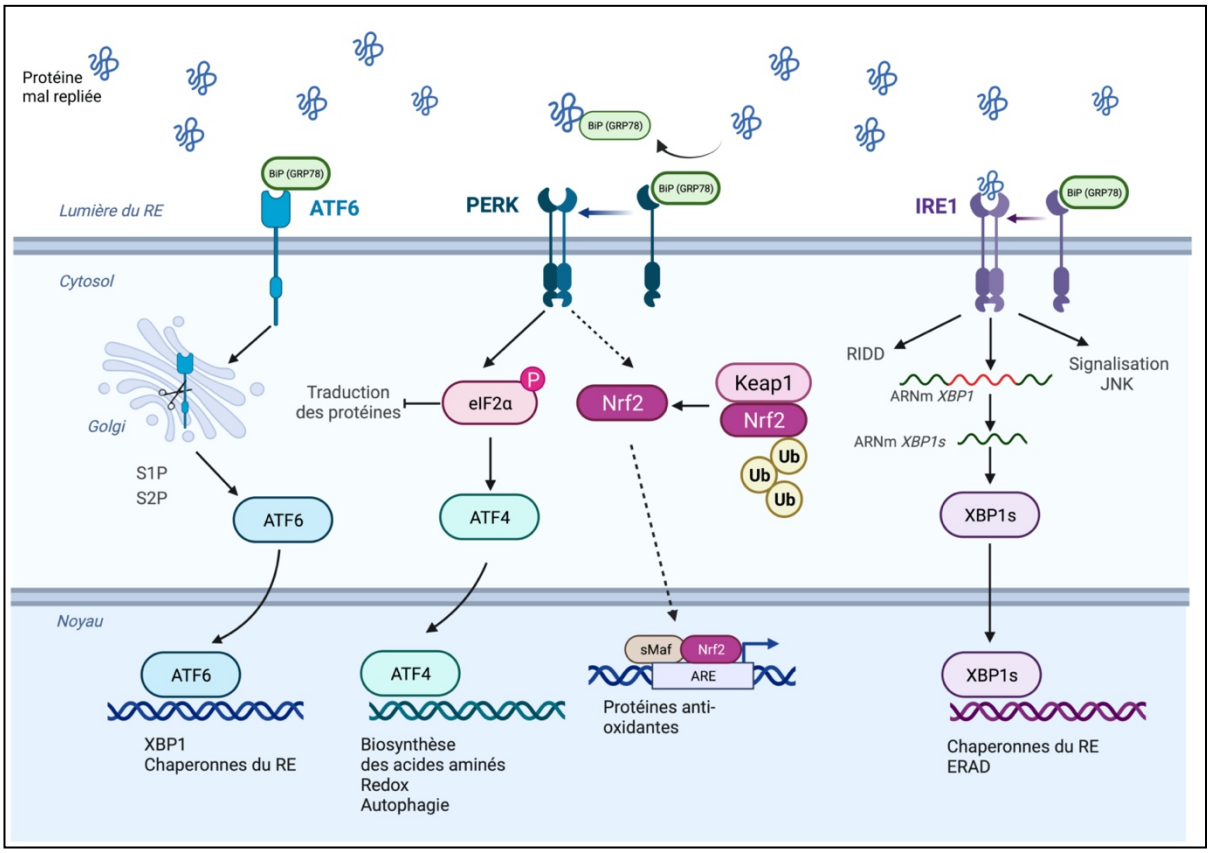


Figure 11 Voies ATF6, PERK et IRE1 de la réponse au stress du RE (UPR). Suite à un stress du RE, BiP se dissocie de ATF6 et induit sa translocation du RE vers le Golgi où il est clivé par les protéases S1P et S2P. Cela libère le domaine N- terminal cytosolique de ATF6 qui transloque dans le noyau pour activer la transcription de chaperonnes du RE et de XBP1. La dissociation de BiP de PERK induit son activation par dimérisation et autophosphorylation qui active en phosphorylant eiF2α entrainant l'inhibition de la traduction des protéines mais l'activation de ATF4 contrôlant la biosynthèse des acides aminés, la traduction de plusieurs gènes codant pour des chaperonnes impliquées dans l'homéostasie redox et du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP. En parallèle, PERK peut activer la voie de détoxification des ROS par la libération de NRF2 de KEAP1. Enfin, la dissociation de BiP de IRE1 conduit à son oligomérisation et autophosphorylation qui induit un changement conformationnel activant son domaine endoribonucléase (RNase) permettant l'épissage alternative de l'ARNm du facteur de transcription XBP1 dans le cytosol. XBP1s transloque dans le noyau où il active la transcription de chaperonnes du RE et la voie ERAD. L'activation de IRE1 peut induire la voie pro-apoptotique ASK1/JNK.

3. CALR et la régulation de l'homéostasie calcique

La plupart du calcium de la cellule est stocké dans le RE (Stanley et Steidl, 2016). La CALR permet la rétention du calcium dans le RE grâce aux charges négatives présentes dans son domaine C-terminal (Michalak et al., 2009). Les cellules déficientes en CALR présentent un stockage réduit du calcium dans le RE (Nakamura et al., 2001) et entraine la perte de l'homéostasie des lipides cellulaires (Wang et al., 2017). Le KO de *Calr* est létal chez la souris

dû à un défaut du développement cardiaque (Mesaeli et al., 1999). Le calcium joue un rôle important dans l'adhésion cellulaire, la morphologie cellulaire et la motilité (Coppolino et al., 1997 ; Liu et al., 1994). Par ailleurs, il a été montré que la CALR, via le calcium, joue un rôle dans la prolifération des MK. En effet, la signalisation dépendante de MPL induit l'activation de STAT, ERK et AKT ainsi que la formation d'inositol triphosphate (IP_3) qui induit le relargage du calcium du RE dans le cytosol. La protéine *stromal interaction molecule* 1 (STIM1) localisée au niveau de la membrane du RE est un senseur du niveau en calcium du RE et est maintenue dans une configuration inactive par son interaction avec ERp57 et CALR (Prins et al., 2011). Lorsque le RE se vide en calcium, STIM1 est libéré de son interaction avec CALR-ERp57 pour s'oligomériser à la membrane plasmique et se lier aux canaux calciques *calcium release activated channel* (ORAI), entraînant leur ouverture et l'entrée de calcium extracellulaire.

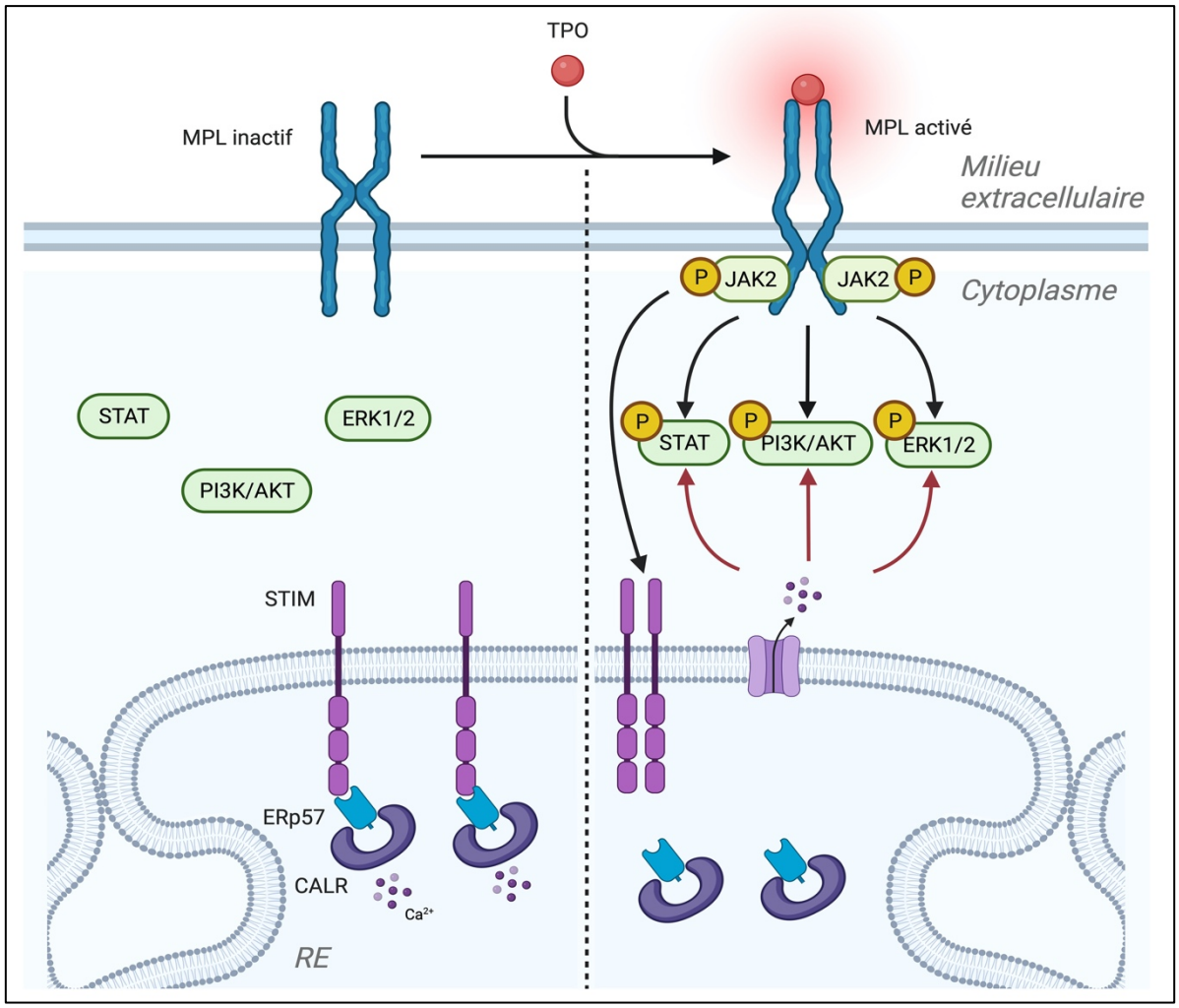


Figure 12 Régulation calcique dépendante du complexe STIM1-ERp57-CALR en aval de MPL. En condition basale, STIM1 (en violet clair) est lié à la CALR *via* ERp57 (bleu) dans le RE. L'activation de MPL induit une dimérisation de STIM qui se sépare du complexe CALR/ERp57 et conduit à la libération de calcium dans le cytoplasme et contribue à l'amplification du signal des voies STAT, PI3K/AKT et ERK1/2.

L'augmentation de la concentration cytosolique en calcium soutient la phosphorylation durable des voies de signalisation en aval de MPL, probablement via l'inactivation de phosphatases (Figure 12) (Di Buduo et al., 2020).

4. Rôle de CALR dans l'immunité

La molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I est essentielle à l'activation de la réponse T CD8 cytotoxique. Ces lymphocytes jouent un rôle majeur dans l 'élimination de cellules présentant des peptides pathogéniques ou issus de protéines associées à une transformation maligne. Les peptides antigéniques sont générés par le protéasome dans le cytosol puis transportés dans le RE par le *transporter associated with antigen processing* (TAP) où ils sont chargés sur le CMH-I à l'aide de la CALR. La CALR est donc importante à la fois pour assurer le repliement correct du CMH-I et pour son chargement.

De plus, un niveau élevé de stress au niveau du RE peut induire la translocation de la CALR vers la membrane plasmique via le Golgi par la voie canonique (Garg et al., 2012 ; Liu et al., 2020 ; Obeid et al., 2007). Son expression à la surface des cellules joue le rôle de signal de phagocytose de la cellule et est importante dans le processus de mort cellulaire immunogène (Bedard et al., 2005 ; Brown et Neher, 2012 ; Gardai et al., 2003 ; Michalak et al., 2009). Par ailleurs, la sécrétion de CALR soluble dans le plasma, suite à la mort de cellules, serait impliquée dans la régulation de la fonction des macrophages via le complexe C1q du complément (Osman et al., 2017).

II. Mutations de *CALR*

1. Impact des mutations *CALR* dans les NMP

Les mutations du gène codant pour la CALR ont été mises en évidence en 2013 par les équipes de R. Kralovics et A.R. Green. Les mutations de *CALR* sont acquises au niveau des CPSH de la MO (Klampfl et al., 2013 ; Nangalia et al., 2013). A ce jour, plus d'une cinquantaine de mutations *CALR* ont été identifiées chez les patients souffrant de TE ou MF et se situent toutes au niveau de son exon 9. Toutes les mutations de *CALR* induisent un décalage du cadre de lecture d'une pb conduisant à la génération d'une nouvelle queue C-terminale chargée positivement commune à tous les mutants (dérégulation de l'homéostasie calcique), ainsi qu'à la perte du motif KDEL de rétention dans le RE entrainant sa sécrétion.

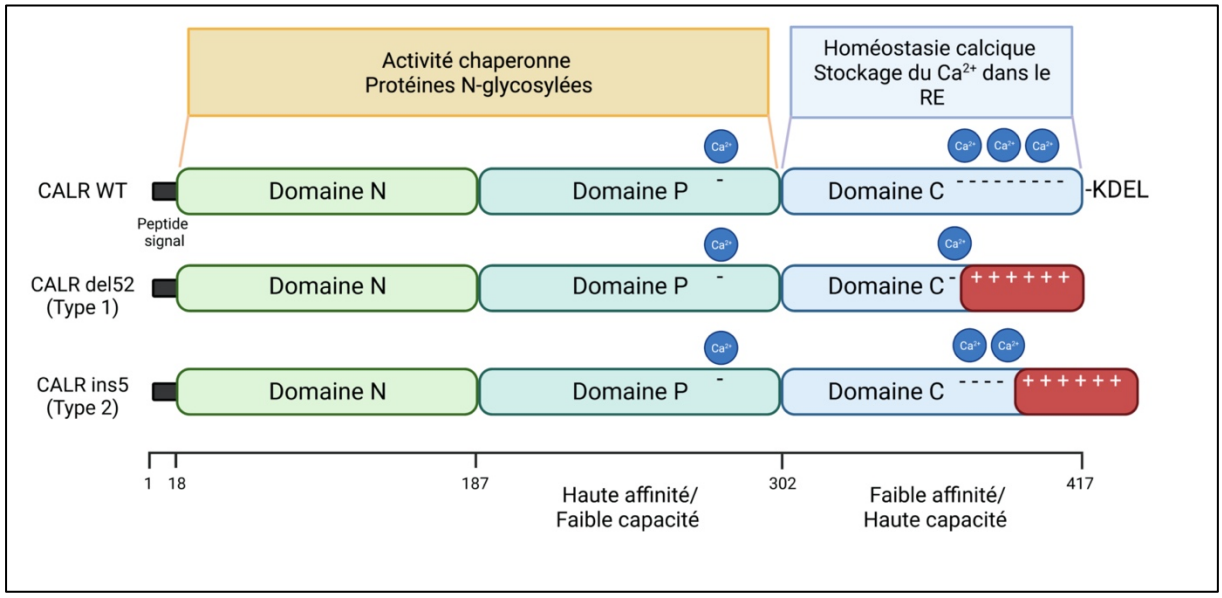


Figure 13 Structure protéique de la CALR et ses mutants les plus fréquents. La CALR WT est composée d'un peptide signal, de domaines N et P (en verts) impliqués dans son activité chaperonne et d'un domaine C-terminal (en bleu) chargé négativement permettant la liaison des ions calcium ($Ca2^{+}$). Les mutations de *CALR* entrainent un décalage du cadre de lecture (+1) aboutissant au remplacement du C-terminal par une nouvelle queue C-terminale mutée (en rouge) et en la perte du signal KDEL de rétention dans le RE. La nouvelle séquence C-terminale de 36 acides aminés est commune à tous les mutants et chargée positivement (+).

En effet, les mutants CALR (CALRmut) ont été détectés dans le plasma des patients et des souris (Balligand et al., 2020 ; Liu et al., 2020). Les deux *CALRmut* les plus fréquentes sont une délétion de 52 pb (del52, c.1092_1143del) définissant le type 1 et une insertion de 5 pb (ins5, c.1154_1155insTTGTC) ou type 2. En termes de structure, la principale différence entre les CALRdel52 et CALRins5, est le nombre de charges négatives résiduelles. En effet, CALRins5 ou type 2 retient 50% de charges négatives du domaine C-terminal par rapport à CALRdel52 ou type 1 (Figure 13) (Pietra et al., 2016).

Dans le RE, les CALRmut se fixent spécifiquement à la forme immature, en cours de glycosylation, de MPL *via* l'oligosaccharide $Glc_1Man_9GlcNAc_2$ fixé sur une asparagine (N117) du domaine N-terminal du récepteur et active constitutivement non seulement la signalisation JAK2/STAT mais aussi les voies PI3K et AKT dans les lignées et les MK de patients *CALRmut* (Chachoua et al., 2016 ; El-Khoury et al., 2020b). Ceci entraine l'indépendance aux cytokines dans les lignées cellulaires uniquement en présence du récepteur MPL et dans une moindre mesure en présence du G-CSFR (Chachoua et al., 2016 ; Marty et al., 2016a). La génération de modèles IPSC à partir de cellules de patients mutés *CALRdel52* et *CALRins5,* donc en présence de niveaux physiologiques de CALR, a mis en évidence que les CALRmut sont capables d'induire une pousse autonome de progéniteurs hématopoïétiques et de l'ensemble de la lignée mégacaryocytaire dépendant de la voie JAK2/STAT (Secardin et al., 2021).

L'expression à la surface du complexe MPL/CALRmut ainsi que l'oligomérisation des CALRmut sont des prérequis pour l'activité oncogénique des CALRmut (Araki et al., 2019 ; Pecquet et al., 2019a). En effet, en utilisant la bréfeldine A qui bloque le trafic par la voie canonique par le Golgi jusqu'à la membrane, l'activité oncogénique de CALRmut est inhibée (Masubuchi et al., 2020). Ce mécanisme entraine l'indépendance aux cytokines dans les lignées cellulaires uniquement en présence du récepteur MPL et dans une moindre mesure en présence du G-CSFR ainsi que dans les progéniteurs MK de patients (Chachoua et al., 2016 ; Marty et al., 2016a). MPL et JAK2 sont nécessaires à la pousse spontanée des MK puisque celle-ci est fortement inhibée par leur inhibition partielle par des shARN. De manière intéressante dans les MK de patients, les voies et gènes dérégulées par la CALR type 1 ont été trouvés plus nombreux qu'avec CALR type 2 (El-Khoury et al., 2020b). Enfin, la CALRdel52 sécrétée agit également comme une cytokine anormale qui augmente la mégacaryopoïèse de façon très spécifique (Pecquet et al., 2019b).

Par ailleurs, la perte de la CALR au niveau du RE, liée à sa sécrétion, induit une dérégulation de l'homéostasie calcique. Une étude sur des MK de patients *CALRmut* a permis de montrer que l'inhibition de l'entrée de calcium dans la cellule via la machinerie SOCE (*stored-operated calcium entry*) induit une diminution de la prolifération des MK. On comprend donc que la prolifération des MK passe par l'activation du SOCE par les CALRmut (Di Buduo et al., 2020). L'amplification du compartiment mégacaryocytaire est donc due non seulement à l'effet direct des mutants sur la signalisation induite par MPL mais également à la perte de la rétention de CALR dans le RE agissant à la fois sur une amplification

(oligomérisation à la surface) et la prolongation (augmentation du calcium cytosolique) de la signalisation oncogénique de MPL et via des mécanismes indépendants de MPL qu'il reste à déterminer. Par ailleurs, une étude récente a montré que l'inhibition de la N-glycosylation en utilisant l'inhibiteur 2-DG sur des souris KI *CALRdel52* hétérozygotes permettait de diminuer les niveaux d'expression de MPL à la surface et donc une diminution de l'amplification des CSH, des progéniteurs MK mais donc de la thrombocytose (Jutzi et al., 2022).

2. Impact des mutants CALR sur le stress RE

Les CALRmut sont sécrétés dans le plasma sanguin (Liu et al., 2020 ; Pecquet et al., 2019b). On comprend donc que la sécrétion de cette chaperonne impliquée dans le repliement de certaines protéines ainsi que dans le stockage du calcium dans le RE puisse conduire à un dérèglement de l'homéostasie du RE. En effet plusieurs équipes ont montré que CALRmut induisait un stress du RE et une activation de la réponse UPR. Il a été montré que CALRdel52 et CALRins5 exprimées dans des cellules K562 induisent la réponse UPR et une réponse anti-oxydante (Salati et al., 2018). De manière contradictoire, Mansier *et al.* ont montré que l'expression de CALRmut ne modifie ni l'homéostasie du RE ni la sensibilité des lignées cellulaire UT-7 à l'apoptose induite par le stress du RE. Cependant, ils ont constaté que l'expression des gènes de la voie de l'ERAD du protéasome était sélectivement altérée en présence de CALRmut (Mansier et al., 2019). De plus, plusieurs équipes ont montré une régulation positive de l'expression de gènes impliqués dans la voie de réponse au stress du RE dans des lignées, chez la souris, mais également dans des cellules de patients atteints de NMP. En effet, les CALRmut dans la lignée Ba/F3 induisent une augmentation de l'expression des gènes de l'UPR tels que BiP, Hspa9/Grp75 et Hspa8 (Pronier et al., 2018). L'étude de transcriptomes de cellules $CD34^+$ de patients NMP a permis de montrer que *XBP1* était différentiellement exprimé dans ces cellules par rapport aux contrôles, mais également les gènes cibles de ATF6 (Nam et al., 2019). Des études similaires menées chez la souris ont permis de montrer une régulation positive de l'expression des voies de l'UPR dans les CSH *CALRdel52* (Prins et al., 2020 ; Shide et al., 2019). De récentes études ont montré que les 2 types de *CALRmut* semblent induire des réponses différentes au stress du RE. En effet, les études transcriptomiques de l'équipe de Shannon Elf ont montré que *CALRins5* activait plus fortement la voie ATF6 de l'UPR que les cellules exprimant *CALRdel52*. L'équipe a invalidé ATF6

avec un shRNA lui permettant de déterminer l'importance de ce facteur de transcription dans la prolifération et la survie des cellules *CALRins5* par rapport aux cellules *CALRwt* et *CALRdel52* (Arellano et al., 2021). De plus, ils ont mis en évidence que la déplétion en Ca^{2+} du RE conséquente à la présence de CALRmut, particulièrement CALRdel52, induit une activation de la voie de l'UPR IRE1/XBP1 et que l'inhibition de cette voie induit la mort cellulaire dans des lignées BA/F3 et UT-7 *CALRdel52* (Ibarra et al., 2022).

3. Impact des mutants CALR sur l'immunité

L'analyse du profil mutationnel des granuleux de patients NMP a été utilisé afin de générer une bibliothèque virtuelle de peptides et prédire les néoantigènes uniques chez ces patients. L'étude a révélé que les CALRmut généraient des néoantigènes récurrents présentant une forte affinité pour le CMH-I ce qui pourrait en faire une piste pour l'immunothérapie (Schischlik et al., 2019). Par ailleurs, une étude de l'équipe de Guido Kroemer en collaboration avec notre équipe sur des patients et sur des souris KI exprimant CALRdel52 a permis de montrer l'implication de la CALRmut dans la mort cellulaire immunogène. En effet, les CALRmut inhibent la phagocytose des cellules cancéreuses mourantes par les cellules dendritiques, supprimant ainsi les réponses immunitaires antinéoplasiques et démontrant les effets immunosuppresseurs paracrines des CALRmut (Liu et al., 2020).

III. Modèles de souris

Les modèles de souris représentent le système le plus intéressant pour comprendre les fonctions motrices des mutations dans l'étude du développement et de l'évolution des NMP. Les premiers modèles de souris exprimant les *CALRmut* ont été ceux utilisant l'infection rétro-virale. Ces modèles ont permis de confirmer que *CALRdel52* et *CALRins5* induisaient bien chez la souris une thrombocytose dépendante du récepteur MPL évoluant vers la MF de façon plus fréquente en présence de *CALRdel52* (Elf et al., 2016 ; Marty et al., 2016b ; Nguyen, Morse, et Fleischman, 2016) (Cabagnols et al., 2015).

D’autres modèles exprimant des mutants plus rares de la CALR de type 1-like et type 2-like ont confirmé de que ces souris développent un phénotype comparable au souris type 1 et type 2, respectivement (Toppaldoddi et al., 2019).

Un modèle de souris transgénique a ensuite été développé afin d’exprimer la CALRdel52 humaine (Shide et al., 2017). De manière surprenante, les souris ont développé un phénotype faible avec un avantage compétitif modéré.

Afin d’étudier l’effets de ces mutations de manière plus physiologique, des modèles de souris KI ont été générés. La plupart des modèles de souris *CALRmut* récapitulent un phénotype de type TE très modéré (Balligand et al., 2020 ; Li et al., 2018 ; Shide et al., 2019).

Tableau 2 Récapitulatif des modèles de souris portant des *CALRmut*.

TYPE DE MODELE	MUTATION	PHENOTYPE	REFERENCE
RETROVIRAL			
	CALR*del52* humaine	TE légère	Elf *et al.,* 2016
	CALR*del52* humaine	TE	Nguyen *et al.*, 2016
	CALR*del52* humaine	TE vers MF	Marty *et al.*, 2016
	CALRins5 humaine	TE	Marty *et al.*, 2016
	CALR*del34* humaine	TE vers MF	Toppaldoddi *et al.*, 2018
	CALR*del19* humaine	TE	Toppaldoddi *et al.*, 2018
	CALR*del46* humaine	TE vers MF	Toppaldoddi *et al.*, 2018
TRANSGENIQUE			
« KNOCK-IN »	CALR*del52* humaine	TE	Shide *et al.*, 2017
Conditionnel ; Mx1-Cre	CALR*del52* murine (exon 9 humain)	TE vers MF	Li *et al.*, 2018
Constitutif	CALR*del61* murine	TE légère	Balligand *et al.*, 2019
Constitutif	CALR*del52* murine	TE	Balligand *et al.*, 2019
Constitutif	CALR*del19* murine	TE	Shide *et al.*, 2019

Les modèles de souris exprimant les *CALRmut* sont plus amplement détaillés dans la revue ci-dessous en comparaison avec les autres modèles de souris pour les NMP exprimant les mutations *JAK2*^{V617F} et de *MPL*. La revue adresse comment ils ont amélioré notre compréhension générale des NMP en ce qui concerne :

- Les mécanismes de la fibrose, de la thrombose/des hémorragies et du déclenchement de la maladie.
- L'avantage clonal et les cellules à l'origine des NMP.
- Les rôles de mutations additionnelles et des voies de signalisation dans la progression de la maladie.
- Le développement préclinique de nouvelles thérapies.

Lessons from mouse models of MPN

Camelia Benlabiod[a,b,c,†], Tracy Dagher[a,b,c,†], Caroline Marty[a,b,c,*], and Jean-Luc Villeval[a,b,c,*]

[a]INSERM, UMR 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France
[b]Université Paris-Saclay, UMR 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France
[c]Gustave Roussy, UMR 1287, Villejuif, France
*Corresponding authors: e-mail address: caroline.marty@gustaveroussy.fr; jean-luc.villeval@gustaveroussy.fr

Contents

1. "Of mice and Men" 2
2. MPN driver mutations via the JAK2/STAT signaling pathway 6
3. Modeling MPN in mice—An up-to-date description 7
   3.1 Pioneer mouse models of MPNs 8
   3.2 Engineered *JAK2*-mutated mouse models 10
   3.3 Engineered *MPL*-mutated mouse models 15
   3.4 Engineered *CALR*-mutated mouse models 15
4. Lessons from MPN mouse modeling: What it means for patients 17
   4.1 Fibrosis 17
   4.2 Thrombo-hemorrhagic complications 22
   4.3 MPN disease initiation/clonal advantage 25
   4.4 Role of additional mutations 30
   4.5 Deciphering the mechanisms responsible for the MPN phenotype 36
   4.6 Preclinical mouse MPN model studies, two iconic examples 41
5. Conclusions and remarks 44
Acknowledgments 45
References 45

Abstract

Over the past decades, a variety of MPN mouse models have been developed to express in HSC the main mutations identified in patients: *JAK2*^{V617F}, *CALRdel52* or *ins5* and *MPL*^{W515L}. These models mimic quite faithfully human PV or ET with their natural evolutions into MF and their hemostasis complications, demonstrating the driver function of these mutations in MPN. Here, we review these models and show how they have

† These authors contributed equally.

International Review of Cell and Molecular Biology
ISSN 1937-6448
https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2021.02.009

Copyright © 2021 Elsevier Inc.
All rights reserved.

improved our general understanding of MPN regarding (1) the mechanisms of fibrosis, thrombosis/hemorrhages and disease initiation, (2) the roles of additional mutations and signaling pathways in disease progression and (3) the preclinical development of novel therapies. We also address controversial results between these models and remind how these models may differ from human MPN onset and also how basically mice are not humans, encouraging caution when one draw lessons from mice to humans. Furthermore, the contribution of germline genetic predisposition, HSC and niche aging, metabolic, oxidative, replicative or genotoxic stress, inflammation, immune escape and additional mutations need to be considered in further investigations to encompass the full complexity of human MPN in mice.

1. "Of mice and Men"

Before starting this review, it seems necessary to remember that "mice are not small people," as Robert Weinberg said (Rangarajan and Weinberg, 2003). Mouse models have proven extraordinarily useful in understanding various aspects of human tumors, including myeloproliferative neoplasms (MPNs), but the two species have accumulated many genetic differences since their most recent common ancestor 91 million years ago (Table 1). These differences may explain some discrepancies between patients and mouse models expressing the same mutation.

Mice have a shorter genome than humans (2.5 compared to 2.9×10^9 letters) with only 1% of unique genes. Mice tend to form cancers in different tissues than human (mesenchymal compared to epithelial) and develop lymphoma, leukemia, sarcoma and less frequently carcinoma or melanoma. They have a short lifespan (2.5 years) with fewer cell divisions than humans (10^{11} versus 10^{16}). Thus, mice undergo about 10^5 fewer cell divisions in a lifetime than humans that should theoretically lead to less risk of genetic damage and cancer. Yet, the lifetime risk of developing cancer is comparable in both species (30%). Therefore, millions of years of evolution have led to a decrease in cancer susceptibility and increased anti-neoplastic mechanisms in humans. Among these mechanisms are the regulation of oxidative stress and telomere length and the usage of different tumor repressor pathways. The high oxidative metabolism rate of mice (sevenfold higher compared to humans) increases the levels of endogenous oxidants and other mutagens causing frequent DNA damages (mice excrete 18-fold more DNA breakdown products per kg of body weight than humans do). Telomerase, protecting the chromosome ends from degradation, is highly active in mice and barely active in humans, explaining the long mouse compared to human

ARTICLE IN PRESS

Table 1 Summary of the main differences between mouse and human biology, cancer risk and immuno/hematology.

Characteristics/Species	Mouse	Human
Gene sharing (%)	99	99
Direct gene alignment (%)	40	40
Genome length (letter)	2.5×10^9	2.9×10^9
Weight (kg)	0.035	70
Life span (years)	2.5	79
Division (lifetime)	10^{11}	10^{16}
Oxidative stress metabolism (ratio)	7	1
Risk of developing cancer	30%	30%
DNA breakdown products (/kg of BW)	18	1
Telomere length (kb)	50	10
Telomerase activity	high	Low
Dominant cell-cycle arrest pathway	p53	RB
Dominant age-related cancers	Mesenchymal-related: lymphoma, sarcoma, leukemia, …	Epithelial-related: skin, breast, prostate, lung carcinoma, …
Bone marrow cellularity	High	low
Stress-related spleen hematopoietic activity	High	low

Continued

ARTICLE IN PRESS

Table 1 Summary of the main differences between mouse and human biology, cancer risk and immuno/hematology.—cont'd

Characteristics/Species	Mouse	Human
RBC life span (day), size (fL) and number (/μL)	$45/45/9 \times 10^6$	$120/90/4.5 \times 10^6$
Platelet life (day) size (fL) and number (/μL)	$5/5/10^6$	$10/10/0.3 \times 10^6$
Dominant leukocyte in blood	Lymphocytes	Granulocytes
Human immune genes absent in mice	–	TLR10, caspase 10, some chemokines
HSC phenotype/Identity	c-Kit$^+$/*Sca*I$^+$/CD150$^+$/CD48$^-$/CD34$^-$	c-Kit$^+$/CD34$^+$/CD38$^-$/CD90$^+$/CD49f$^+$
HSC replication rate (per week)	2.5	40
Active/quiescent HSC (ratio)	1.46	0.116

These are caused by 180 Mya of cumulating time of independent evolution in distinct environments and pressures of natural selection. For the mice, the C57/Bl6 strain was chosen as a reference, differences exist between strains. RBC, red blood cell; HSC, hematopoietic stem cell; Rb, retinoblastoma.

telomere (≈50 kb versus 10 kb). Therefore, murine cells easily undergo spontaneous immortalization leading to cancer, whereas human cells undergo telomere erosion/shortening with senescence and "crisis"/death as cancer protection, unless de-repressing telomerase expression. Finally, regarding two pathways associated with senescence and cell-cycle arrest, p53 and the retinoblastoma (RB) are respectively dominant in mouse and in humans, possibly explaining that *p53*-deficient mice shift from "murine-like" mesenchymal to "human-like" epithelial cancers (Rangarajan and Weinberg, 2003).

The hematology of mice or humans has also some specific features. In particular, bone marrow (BM) cellularity is elevated in mice (filling 90% of the medullary space) in contrast to the paucicellular marrow of humans. As a consequence, mouse BM cannot extend in response to stress. Instead, the spleen, characterized by the dominant lymphoid white pulp, can become, in the red pulp, an active site for an exuberant trilineage myeloid hematopoiesis (granulocytic, erythroid and megakaryocytic) in response to stress such as anemia, infections and neoplastic hyperproliferation such as MPNs. Therefore, the extramedullary role of the spleen in mice should be considered in addition to the BM site to fully characterize a hematologic phenotype (O'Connell et al., 2015). Indeed, a 4–5-fold increase in spleen weight represents the same cellularity found in the total BM of a mouse (based on one femur representing 6% of total BM and 1 g of spleen representing 10^9 cells).

Mice also have small red blood cells (RBCs) and platelets with a short lifespan compared to human (Table 1). Lymphocytes are the predominant blood leukocytes in C57BL/6 mice. In contrast, in C3H mice granulocytes are the blood dominant cells, similarly to humans. Immunology is different between mice and humans. Indeed, mice are lacking some critical human immune genes such as neutrophil defensins, TLR10, FcγRI and FcγRIIA, caspase 10 and several chemokines (IL-8, NAP-2, ITAC, MCP-4, HCC-1, HCC-2, MPIF-1, PARC, eotaxin-2/3) (Mestas and Hughes, 2004). Furthermore, the phenotypic and functional characteristics of monocytes, dendritic cells and natural killers are also different (Rongvaux et al., 2013).

Considering hematopoietic stem cells (HSCs), the specific signatures of mouse and human repopulating cells are divergent. For example, while CD34 expression is present on human HSC, its expression is minimal on mouse HSC and marks more differentiated progenitors. Sca-1 is very useful in mouse HSC isolation but no such molecule exists in human. Also, human HSCs replicate slowly, once every 40 weeks on average instead of once

every 2.5 weeks for mice. Consequently, the steady-state ratio of active clones contributing to hematopoiesis compared with quiescent clones is approximately 1.46 for mice but only 0.116 for humans (Sykes and Scadden, 2013).

Overall, these differences have to be kept in mind when data from mouse models are analyzed and discussed. Having said that, the mouse is and will remain the model of choice for human disease thanks to the knowledge that has been accumulated over the years on this animal, as we try to summarize it. Moreover, mice present practical advantages such as small size, reliable breeding and short lifespan. We will show here how precious murine models have been in the understanding of MPN etiology, disease initiation and evolution, the identification of the mechanisms of fibrosis and hemostasis disorders, the role of additional mutations and the development of some preclinical approaches.

2. MPN driver mutations via the JAK2/STAT signaling pathway

Classical non **BCR-ABL** MPNs are a group of hematological malignancies characterized by the over-production of one or several mature and functional cells from the myeloid lineages: red blood cells with a variable granulocytic/megakaryocytic hyperplasia in polycythemia vera (PV), megakaryocytes (MKs)/platelets in essential thrombocythemia (ET) and granulocytes plus dysplastic MKs with a BM invalidating deposition of collagen fibers in primary myelofibrosis (PMF). The three disorders form a continuum with frequent evolution from ET to PV, from PV to secondary myelofibrosis (MF) and from ET to MF. PMF is the most severe and heterogeneous MPN and usually presents other clinical symptoms such as splenomegaly and/or hepatomegaly due to extramedullary hematopoiesis. MPNs are prone to hemostasis complications such as thrombosis and hemorrhage, and to transformation to acute myeloid leukemia (AML).

MPNs are clonal disorders due to the acquisition of gain-of-function mutations at the HSC level in three main genes encoding: JAK2, the thrombopoietin (TPO) receptor (MPL) and calreticulin (CALR) (James et al., 2005; Klampfl et al., 2013; Nangalia et al., 2013; Pikman et al., 2006; Scott et al., 2007). *JAK2*^{V617F} is the most prevalent mutation before *CALRdel52* (type 1) and *CALRins5* (type 2), *MPL*$^{W515L/K/N}$ and *JAK2 exon12* mutation. These mutations are detected in patients with various phenotypes (*JAK2*^{V617F} in all three MPNs, mutations of *CALR* and *MPL*

ARTICLE IN PRESS

exclusively in ET and MF, *JAK2 exon12* in PV/MF). They lead to the constitutive activation of type I homodimeric cytokine receptors via the JAK2/STAT signaling pathway: the erythropoietin (EPO), TPO or/and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptors. Based on mouse modeling, these gain-of-function mutations have been characterized as phenotypic drivers of the diseases. Heterogeneity of MPNs, in particular of PMF, is explained by the acquisition of additional non-phenotypic mutations targeting genes encoding epigenetic regulators (DNA methylation and histone modifiers), components of the splicing machinery and transcriptional factors that are frequently found in myelodysplastic syndromes and AML.

Anomalies found in patients have been modeled using different approaches in mice. Most, but not all of them, faithfully mimic human MPNs and have been useful, as we will detail it in the following paragraphs, in understanding the physiopathology of MPN.

3. Modeling MPN in mice—An up-to-date description

Several strategies have been used to model the different recurrent mutations that were identified in MPN patients. They allow characterizing a mutation as driver of the phenotype.

The **retroviral (RV)** strategy will limit the expression of the gene of interest to the hematopoietic system via BM transplantation. This is a fast process that possesses the major drawback of uncontrolled both copy numbers and RV random sites of integration that might cause the undesirable expression of surrounding genes. It is usually characterized by an overexpression of the transgene compared to its physiological level. Moreover, engraftment exposes HSCs to high levels of cytokines, replication and oxidative stress causing possible genetic and physiologic artifacts.

The **transgenic (TG)** technology also uses random gene integration, except when targeting into the ubiquitous constitutively expressed *Rosa26* locus (not used in MPN models). The level and tissue-specific expression of the transgene depends on the promoter used and differs from the physiological level. Compared to the RV technology, mice present the advantage of germline transmission by breeding.

In **knock-in (KI)** models, the modified gene is targeted into its own locus via homologous recombination and its expression is thus dependent on the endogenous gene promoter. This model is the most faithful to the human disease. Constitutive KI models mimic the effect of inherited

mutations but a BM graft may limit the expression of the mutated gene to the hematopoietic tissue. The Cre-loxP system has allowed the development of conditional KI mice in which expression of the KI is dependent on the expression of a Cre recombinase that can be controlled (1) by a tissue-specific promoter and (2) in a timely manner using either a modified inducible Cre (tamoxifen-inducible CreER^{T}, upon nucleus translocation) or an inducible promoter such as the interferon-inducible *Mx1* promoter. As mutations in sporadic MPNs are acquired in the HSCs, conditional inducible KI models efficiently mimic the human pathology using hematopoietic promoters such as the *Vav*-Cre (Croker et al., 2004) (embryonic) and the HSC-*Scl*-CreER^{T} (Göthert et al., 2005), with the caveats that these promoters are also expressed in some endothelial cells. CRISPR-Cas9-mediated KI models present similar interests and disadvantages than constitutive KI, being present in all cell types of the organism instead of being limited to HSCs and their progenies.

3.1 Pioneer mouse models of MPNs

Before the discovery of *JAK2*^{V617F} and other driver mutations, several models were described encompassing many features of MPN. The early ones were obtained by RV long-term exposure to cytokines, especially by the team of Gregory Johnson (Metcalf, 1998), including an **EPO RV model** leading to an erythrocytosis (Villeval et al., 1992).

Of particular interest for this review, the so-called **TPO^{High} RV model** has the merit to recapitulate the main features of the **evolution of human PMF with osteosclerosis** and is still used for investigating the mechanistic and therapeutic approaches of human PMF (see Section 4.1). This model was developed to determine the side effects associated with long-term exposure to high doses of the recently discovered TPO (Wendling et al., 1994). Several models were described, including the simplest approach by repeated systemic administration of a truncated version of recombinant TPO associated with a polyethylene glycol tail (PEG-rh-MDGF) (Ulich et al., 1996) and more sophisticated approaches by which TPO overexpression in mice was achieved by adenovirus or retrovirus vectors and engraftment or transgenesis (Cannizzo et al., 1997; Frey et al., 1998; Kakumitsu et al., 2005; Ohwada et al., 1996; Villeval et al., 1997; Yan et al., 1995, 1996). Except for one model of TG mice (Zhou et al., 1997), all the other models described the occurrence of BM fibrosis in mice. Of those, the RV model is the one that has been studied the most extensively to investigate the cells

and mechanisms involved in MF. The procedure consists in transplanting BM cells transduced with a virus expressing the mouse TPO into lethally irradiated recipient mice, to sustain high levels of TPO production by the hematopoietic system throughout the life of the transplanted mouse. The result was a two-step disease. The first "plethoric" phase of the disease (2 months after BM transplantation, BMT) is characterized by thrombocytosis, leukocytosis and anemia, a striking elevation of progenitor cell numbers except for CFU-E, massive hyperplasia of both MKs and granulocytes in BM and spleen with hypoplasia of erythroblasts in the BM. The second phase ("spent" or "burnt-out" phase) is characterized by severe pancytopenia in blood and BM and extramedullary hematopoiesis in the spleen, liver, kidney, lymph nodes, and lungs. Histological examination revealed severe fibrosis in the BM and spleen and osteosclerosis in BM. All animals died within 10 months after transplantation with severe cytopenia. Notably and unique within the MPN animal models, around 5% of mice died prematurely from undifferentiated acute leukemia. Thus, this fatal myeloproliferative disorder strikingly mimics most of the features attached to the evolution of human PMF. The TPO^{High} model mimics the constitutive overstimulation of MPL and is therefore close to the MPL^{W515L} RV model developed by Levine's group (Pikman et al., 2006). However, the MPL^{W515L} RV mice involved the overstimulation of other lineages that do not terminally express MPL resulting into polycythemia at the opposite of human MPL^{W515L} PMF. Both models have the combined disadvantage of being extremely severe and the advantage of being useful to rapidly test drugs and study the mechanisms involved in MF. In contrast, most *JAK2*- and *CALR*-mutated models slowly develop MF after several months. A possibly re-appraised model may be the one obtained through repeated administration of the TPO peptidomimetic Romiplostim, in use for the treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura and some other thrombocytopenia.

The **GATA-1^{low} model** derived from mice ($Gata1^{neodHS}$) with a deletion in a regulatory sequence of GATA1 expressing a deleted version of GATA-1 was developed by Orkin's group with the original aim to investigate the role of this enhancer. As a result of this deletion, mice were both anemic due to a defect in erythroid cell maturation because of a fivefold decrease in GATA-1 expression, and severely thrombocytopenic because of the almost complete lack of GATA-1 expression in MKs that remain immature and release a few abnormally large platelets. Although rapidly lethal in C57BL/6 mice, Vannucchi and Migliaccio reported that in the

CD-1 strain the deletion was viable (Martelli et al., 2005; Vannucchi et al., 2002). Mice slowly recovered from the anemia but remained thrombocytopenic and developed splenomegaly due to the expansion of the MK lineage. After a year, MF and osteosclerosis developed in the BM with splenomegaly associated to extramedullary hematopoiesis. In contrast to the TPO^{High} model, they do not die prematurely. Interestingly, the deletion introduced in the DBA/2 strain induced a severe anemia but no full myelofibrotic phenotype.

Overall, these early models provided evidence that **hyperplasia and/or dysplasia and/or impairment of the MK lineage** were grounds for the development of excess fibrosis in the marrow. Similar observations have been made in non-MPN models such as the ***hBACH1* TG** mouse resulting in MK impairment (Toki et al., 2005), the ***Ts65Dn*** mouse model of Down syndrome (Kirsammer et al., 2008), an ET model with MF caused by the loss-of-function $c\text{-}Myb^{E308G/E308G}$ (Papathanasiou et al., 2017), the chronic induction of TPO in the $SMRT^{mRID}$ **KI** mice (rescue by retinoid antagonists) (Hong et al., 2013) and the lack of alpha-granules in the $Nbeal2^{-/-}$ murine model of gray platelet syndrome (GPS) (Guerrero et al., 2014).

3.2 Engineered *JAK2*-mutated mouse models

$JAK2^{V617F}$ mutation is present in the majority of PV patients (95%) and nearly half (50–60%) of ET and PMF patients. Several mouse models using different strategies expressing either murine (mu) $Jak2^{V617F}$ or human (hu) $JAK2^{V617F}$ have been generated in different genetic backgrounds (Fig. 1A). These models, mimicking the human MPN continuum, have been crucial in the understanding of the molecular pathogenesis of $JAK2^{V617F}$-driven MPNs.

From 2005, four **RV models** using BM cells transduced with a retrovirus expressing mu$Jak2^{V617F}$ were generated in BALB/c or C57BL/6 inbred strains (Bumm et al., 2006; James et al., 2005; Lacout et al., 2006; Wernig et al., 2006; Zaleskas et al., 2006). All these mice developed a disease mimicking human PV progressing or not to MF. Interestingly, leukocytosis, splenomegaly and BM fibrosis were more pronounced in BALB/c compared to C57BL/6 mice, highlighting **mouse strain-specific differences** in disease phenotype probably due to host modifiers (Bumm et al., 2006; Wernig et al., 2006). Bumm et al. (2006) observed a transient non-transplantable disease suggesting no self-renewal capacity and requirement of additional factors such as TNFα levels. Altogether, the RV models

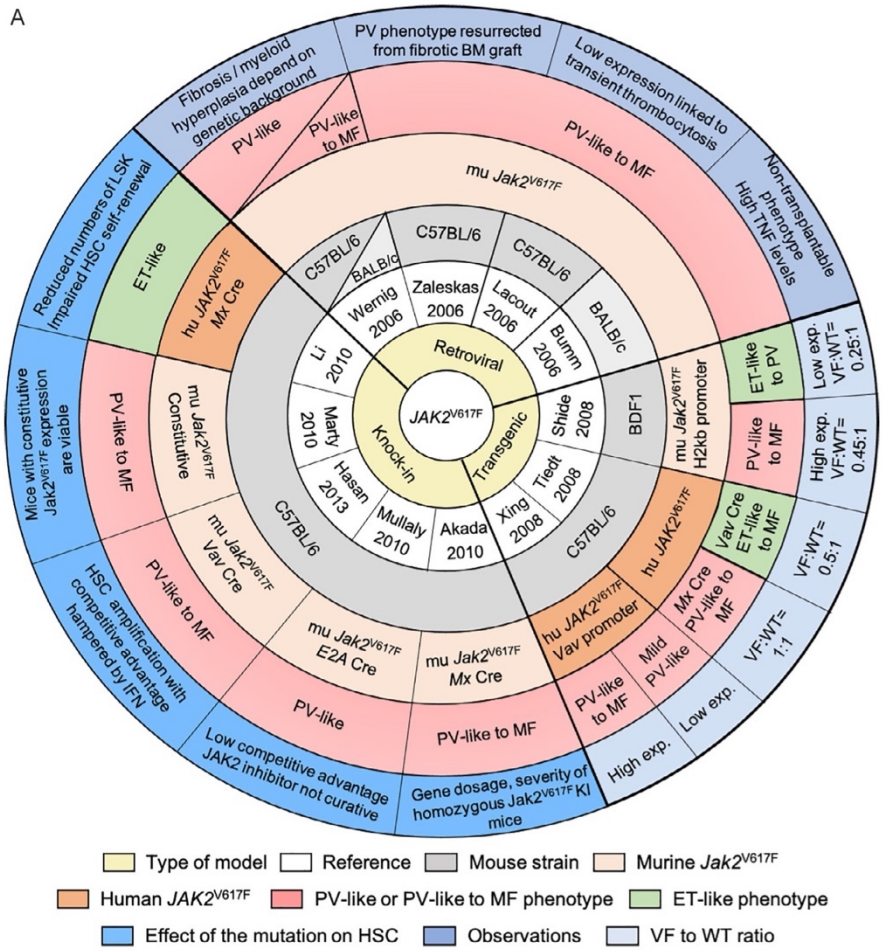


Fig. 1 (A) *JAK2*^{V617F} mouse models. Retroviral, transgenic and knock-in models have been successively developed leading to PV, ET and MF human-like diseases. Starting from the center to the outside are listed in order the mouse model references, mouse strains, the species (murine or human) mutation, the recorded phenotype and some observations related to the phenotype, the expression level or the *JAK2*^{V617F}:*JAK2*^{WT} gene expression ratio (in RV and TG models) or the effect on the stem cell compartment (KI model). (B) *CALRm* mouse models. Retroviral, transgenic (TG) and knock-in models have been successively developed. Starting from the center to the outside are listed in order the mouse model references, the mouse strain, types of KI model, the type of *CALRm*, the phenotypes obtained and in the last circle some observations for each model.

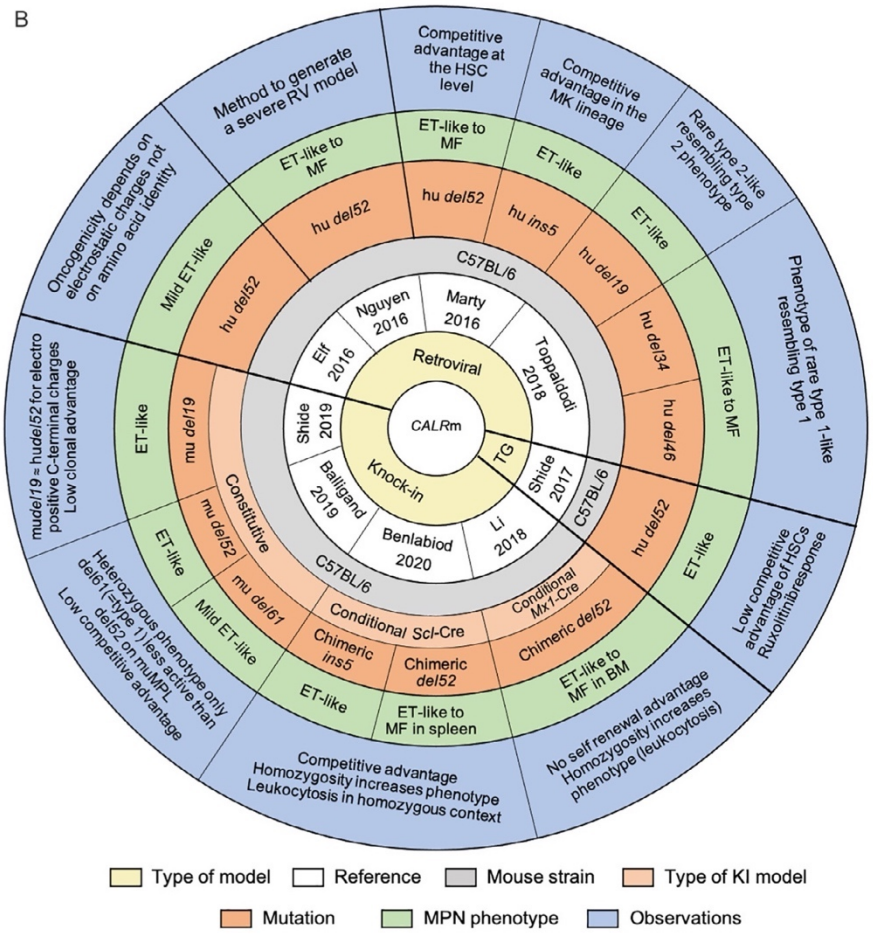


Fig.1—Cont'd

demonstrated that the expression of **JAK2^{V617F} alone is sufficient to induce a MPN** in mice demonstrating it as a driver of the disease (James et al., 2005).

From 2008, three teams developed **TG models** by transferring mu or hu*JAK2*^{V617F} cDNA under the control of different hematopoietic and non-hematopoietic promoters into mouse oocytes to generate stable transgenic lines. In the TG model generated by Shide et al. (2008), mu*Jak2*^{V617F} was stably expressed under the control of the *H2Kb* promoter. Two lines were established in the BDF1 strain, characterized by different expression levels of JAK2^{V617F}. High expression (VF:WT = 0.45:1) of the mutant generated polycythemia progressing into MF, whereas low JAK2^{V617F}

expression (VF:WT = 0.25:1) induced an inter-individual variability (19% of mice developed PV-like features and 35% developed ET-like features) with no progression to MF. Tiedt et al. (2008) generated an original conditional TG mouse expressing several copies of the hu*JAK2*^{V617F} in inverse orientation flanked by antiparallel LoxP sites ("Flip-Flop" transgene) under the control of a minimal hu*JAK2* promoter. These mice were crossed with TG mice expressing Cre under the *Vav* promoter or the *Mx1* promoter with different doses of pIpC (IFN inducer) to generate first increasing numbers of active and second increasing deletion of hu*JAK2*^{V617F} copies. Few doses of pIpC induced high active hu*JAK2*^{V617F} gene copies (VF:WT = 1:1) leading to a PV phenotype as opposed to repeated doses of pIpC or the strong *Vav* promoter inducing the deletions of active hu*JAK2*^{V617F} gene copies (VF:WT = 0.5:1) leading to an ET phenotype. These data demonstrated that the **JAK2^{V617F}/JAK2^{WT} ratio was critical** for the phenotype manifestation. Interestingly, an equal expression of the hu*JAK2*^{V617F} and the mu*Jak2*^{WT} gene resulted in a PV and not an ET phenotype in contrast to human studies predicting an ET phenotype for a heterozygous expression of JAK2^{V617F}. Finally, Xing et al. (2008) generated TG mice using hu*JAK2*^{V617F} cDNA under the control of the *Vav* promoter also showing a correlation between gene expression levels and disease phenotype. Recently, Chapeau et al. developed a special conditional inducible TG mouse model using the *Scl-tTA-2S* tet-off system to initiate the disease but also reverse the disease hallmarks (Chapeau et al., 2019). Interestingly, this is the only one to report of **gender differences** in the manifestation of the disease phenotype where, in an unexpected way, because at the opposite of human tendency studies, female developed a PV and male developed an ET. Taken together, TG mouse models demonstrated for the first time the importance of the *JAK2*^{V617F}-to-*JAK2*^{WT} ratio and thus the dose-dependent role of JAK2 signaling in the MPN phenotype, as expected from human studies.

From 2010, **KI mouse models** were generated via homologous recombination in ES cells allowing expression of JAK2^{V617F} from its endogenous promoter. The four teams that generated a KI model used the same mouse genetic background (C57BL/6/129Sv) but different approaches. Akada et al., Mullaly et al. and Marty et al. used the mu*Jak2*^{V617F} gene, generating mice with a PV-like phenotype progressing into MF (except for the model developed by Mullaly et al.). Akada et al. (2010) generated an inducible *Mx1*-Cre/mu*Jak2*^{V617F} mouse model with an exon13 mutated cDNA and a BM JAK2^{V617F}:JAK2^{WT} 0.53:1 mRNA ratio. Both, heterozygous

and homozygous mice developed a PV but in a more severe manner in the homozygous mice with a progression to MF. Marty et al. generated a constitutive heterozygous (VF:WT mRNA = 1:1) KI mouse model (homozygous mice could not be generated due to the sterility of heterozygous KI females) that developed a severe PV phenotype with a progression to MF (Marty et al., 2010). Mullaly et al. reported *E2A*-Cre/mu*Jak2*^{V617F} KI mice that developed a PV-like phenotype but did not progress to MF (Mullally et al., 2010). In 2013, using the same flexed (Flip-Excision) technology as Mullaly et al., Hasan and colleagues generated a conditional *Vav*-Cre/*Jak2*^{V617F} heterozygous KI mouse model that developed a PV-like phenotype with progression to MF after 6 months (Hasan et al., 2013). Finally, Li et al. developed a *Mx1*-Cre/huJAK2^{V617F} KI mice using the entire hu*JAK2*^{V617F} cDNA resulting in equal expression of murine and human *JAK2* transcripts. Unlike other models, KI mice preferentially developed an ET-like phenotype (10% of PV/MF phenotype) that was not transplantable, revealing a subtle competitive disadvantage relative to normal HSC in the stress associated with BMT (Li et al., 2010). This feature was not observed with mu*Jak2*^{V617F} KI mice asking the question of why the KI model with the mildest phenotype shows the strongest reduction in HSC self-renewal potential (Skoda, 2010).

Overall, several factors including the mouse strain and conditioning (irradiated recipient or native model), gene dosage, gene species (human or mouse) and the method (conditional/inducible models versus constitutive) determine the disease phenotype in engineered mice. KI mice closely recapitulated human MPNs although heterozygosity is always associated with PV, except in Green's model, and heterozygosity is associated with ET in humans (Tiedt et al., 2008). As we will see later, to design more faithful human models and afford a better comprehension of MPN disease initiation, strategies were developed to induce (conditional models) or engraft a **limiting number of mutated HSCs** within the overwhelming WT hematopoiesis, considering that in mouse models the disease is triggered as polyclonal rather than monoclonal or oligoclonal in patients.

In 2007, Scott and colleagues conducted a study on *JAK2*^{V617F}-negative PV and idiopathic erythrocytosis patients and identified four somatic mutations in the **exon 12 of the *JAK2* gene** (Scott et al., 2007). They developed a RV model in BALB/c mice to express the *Jak2*^{K539L} mutation. These mice displayed an elevated hematocrit level but lower leukocytosis and thrombocytosis than the RV *Jak2*^{V617F} mice, suggesting the preferential expansion of the erythroid lineage as observed in patients who preferentially develop an

erythrocytosis. In 2016, Grisouard et al. also studied the *JAK2 exon 12* mutation but in TG mice expressing hu*JAK2-N542-E543del exon 12* mutation. They aimed to study the hematologic phenotype of these mice but also the specific changes caused by this mutation on iron metabolism and STATs (developed in chapter 5 in Grisouard et al., 2016). Briefly, mice had a more severe erythrocytosis compared to the model of Scott et al. possibly explained by the differences of strategies (Tefferi, 2016).

3.3 Engineered *MPL*-mutated mouse models

The somatic $MPL^{W515L/K}$ mutation is found in 1–5% of ET and PMF patients (Pikman et al., 2006). This group modeled MPL^{W515L} into RV mice to induce a rapid MPN disorder with high platelet counts, leukocytosis, marked splenomegaly due to extramedullary hematopoiesis, evolving into a lethal MF. Notably, both MPL^{WT} and MPL^{W515L} RV mice developed a marked increased hematocrit supported by a significant increase in BM and spleen erythroid cell populations. This characteristic is at the opposite of the anemia observed in human MF and probably due to the expression of mutant MPL in erythroid cells. Up to now, no MPL^{W515L} KI has been developed. As previously discussed, this model has been used for numerous preclinical MF studies due to the speed of symptom upset and the short survival allowing a rapid appraisal.

3.4 Engineered *CALR*-mutated mouse models (Fig. 1B)

In patients, the two major types of *CALR* mutations (*CALRm*) located in exon 9 of the gene, *del52* (type I) and *ins5* (type II), are closely found in ET while *CALRdel52* is largely predominant in PMF (70% of all *CALRm*) (Cabagnols et al., 2015). ET patients carrying the *CALRins5* mutation were reported with slightly higher platelet counts than *CALRdel52* patients (Pietra et al., 2016; Tefferi et al., 2014).

The first *CALRm* **RV models** were generated by Marty et al. to express hu*CALRdel52* and hu*CALRins5* into C57BL/6 recipient mice (Benlabiod et al., 2020). The *CALRdel52* mice developed stronger thrombocytosis than *CALRins5* mice. Mice expressing a *CALR* lacking the entire exon 9 did not develop the disease indicating that the **specific mutated C-terminal tail sequence** rather than the absence of the WT C-terminal sequence plays a role in the development of the disease. Six months after transplantation, *CALRdel52* mice, and in rare cases *CALRins5* mice, showed a decrease in platelet counts, anemia, BM hypocellularity and splenomegaly due to

extramedullary hematopoiesis including MK hyperplasia, associated with the development of MF and osteogenesis. Shortly after, Elf et al. generated a hu*CALRdel52* RV model that developed a mild thrombocytosis explained by BM MK hyperplasia (Elf et al., 2016). No evidence of fibrosis was shown. Afterward, a third hu*CALRdel52* RV mouse model was evidenced to develop marked thrombocytosis progressing to MF, like Marty et al. (Nguyen et al., 2016). Toppaldoddi et al. modeled rare type 1-like and spi2;type-2 like *CALRm* in mice (Toppaldoddi et al., 2019). Mice expressing type 1-like *CALRdel34* and *CALRdel46* displayed a phenotype resembling the *CALRdel52* mice. Similarly, the mild thrombocytosis developed by the type 2-like *CALRdel19* RV mice was close to that of *CALRins5* mice, demonstrating that **type 1-like and type 2-like CALR mutants** are structurally and functionally similar to CALRdel52 and CALRins5 mutants, respectively.

In 2017, Shide et al. generated the only *CALRm* **TG model** (Shide et al., 2017). They expressed hu*CALRdel52* under the control of murine *H-2Kb* promoter. The phenotype developed by this TG mouse was surprisingly milder than the RV models with a moderate thrombocytosis, no significant splenomegaly and no MF.

Mu*CALRm* at the homologous position to the hu*CALRm* does not generate the same amino acid sequence and thus, the same mutated C-terminal tail. Therefore, in 2019, Li et al. generated conditional *CALRdel52* **KI mice** expressing a mu*Calr* with the human mutated exon 9 that were crossed with inducible *Mx1*-Cre TG mice (Li et al., 2018). The phenotype, including thrombocytosis, was more severe in homozygous compared to heterozygous KI mice. Homozygous *CALRdel52* KI mice also developed leukocytosis and displayed a mild decrease in hematocrit at 4 months post-induction when moderate fibrosis was observed in the BM, accompanied by MK hyperplasia and splenomegaly associated with an increase in HSCs, megakaryocytic (MkPs) and other myeloid progenitors. Thus, these KI mice recapitulate an ET-like phenotype progressing toward MF. It was later demonstrated that the global charge of the mutated C-terminal tail rather than the amino acid sequence is important in disease development (Balligand et al., 2016; Shide et al., 2019). As it was shown that the oncogenic effect of human CALR was more the consequence of the positive charge of exon 9 than the amino acid sequence itself. Thus, it was possible to generate KI mice with the mu*Calr*. Using the CRISPR-Cas9 technology, Balligand et al. generated constitutive heterozygous mu*Calrdel52* and mu*Calrdel61* KI mice, two type 1 mutations that differ by the absence of three amino acids at the outset of the new positively charged C-terminal tail of *Calrdel61*

(Balligand et al., 2020). Mu*Calrdel61* KI mice displayed a very similar phenotype than control littermates, with the exception of a 15% increase in platelet count. In comparison, mu*Calrdel52* KI mice showed significant thrombocytosis with mild MK hyperplasia in the BM suggesting that a small difference in the amino acid sequence may be important for the oncogenicity of the mutant protein and that not all type 1 CALR mutants behave the same. The same year, Shide et al. published their work on constitutive mu*CALRdel19* KI mice using the CRISPR/Cas9 system in C57BL/6 ES cells (Shide et al., 2019). The mu*Calrdel19* generates a very similar C-terminal tail than the hu*CALRdel52*. These mice developed a mild increase in platelets and BM MKs with no evidence of fibrosis. Splenomegaly was accompanied by extramedullary hematopoiesis (MKs and myeloid progenitors). Lastly, Benlabiod et al. generated heterozygous and homozygous inducible conditional KI mice expressing mu*Calrdel52* and *Calrins5* with the human mutated C-terminal tail (Benlabiod et al., 2020). They showed that *CALRdel52* mice presented a more severe phenotype compared to *CALRins5* mice including thrombocytosis, leukocytosis, BM hypocellularity compensated by extramedullary hematopoiesis leading to splenomegaly. The phenotype was more severe in the homozygous context.

Most *CALRm* mouse models recapitulated an ET-like disorder. It seems that type-1 and type-1 like mutations induce an ET-like phenotype progressing toward mild MF for certain but not all models, when type-2 and type-2 like mutations induce a milder ET-like phenotype with barely any MF progression. These observations recapitulate what is observed in human MPN patients, except for the difference in platelet counts that is higher in *CALRdel52* than in *CALRins5* KI mice while the opposite is true in ET patients. To explain these differences, multiple hypotheses are to be considered including maybe the role of the homozygous clones in the severity of the disease that will be further discussed in Section 4.3. Moreover, the general phenotype induced by *CALRm* observed in mouse is moderate compared to patients, possibly due to the difference in the activation of the muMPL versus the huMPL, which will be developed in Section 4.5.

4. Lessons from MPN mouse modeling: What it means for patients

4.1 Fibrosis (Fig. 2)

Fibrosis, or scarring, is part of the normal process of tissue repair following an injury. It is defined by the accumulation of disorganized fibers or

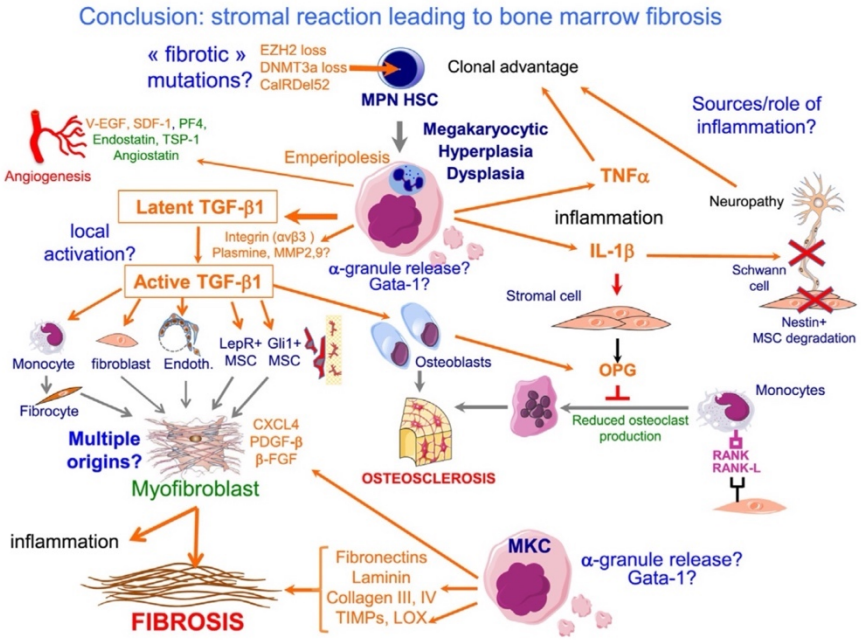


Fig. 2 Main players of the stromal reaction leading to MF identified in MPN mouse models. MKs are the central player in MF. Most MK-derived proteins are found in excess in MF recapitulating the described "cytokine storm" (IL-1, TNF, PDGF, V-EGF, FGF, PF4, …). It is also the major cellular source of **TGF-β1** in BM. TGF-β1 is required for fibrosis and plays a pivotal role in the physiology of MF. Still, two questions remain related to TGF-β1: (1) its release: TGF-β1 is contained in MK α-granules and should not be released unless a process of activation, degradation or dysplasia (apoptosis/necrosis/senescence) is triggered. What kind of process releases TGF-β1 in MF? Hypotheses are "dysplasia" through gene deregulation (*EZH2*, *DNMT3*) or defective granule storage possibly due to low GATA-1 levels, abnormal MKC activation induces by JAK/STAT constitutive activation or neutrophil activation in emperipolesis through P-selectin expression; (2) its activation: TGF-β1 is always released as an inactive latent form and sequestered in the ECM. What kind of TGF-β1 activation mechanism occurs in MF? Possible trigger candidates are MK αvβ3 integrin or nonmyelinating Schwann cell integrin αvβ8 also involved for TGF-β1-induced HSC dormancy. Similarly, **a-SMA myofibroblasts** are also key players in MF being the producer of main ECM components (collagen, glycoprotein, proteoglycan, …) and inflammatory mediators (TGF-β1, IL-1, IL-8, M-CSF and GM-CSF, …). They are regulated mainly by TGF-β1 but also TNFα, IL-1β or IL13. However, the mechanism of production and **origin(s) of myofibroblasts** or other ECM cell producers are largely questioned. The candidates are (1) monocytes-derived fibrocytes, (2) vascular endothelial cells through an endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT), (3) Gli1-positive and/or (4) LepR1-positive mesenchymal stromal cells. Genetic modifiers of MF have been suspected in C57BL/6 versus BALB/c and some mutations favor or accelerate MF occurrence as *EZH2*, *DNMT3a*. **Osteosclerosis**, as the final MF grade, involves **OPG** through reduced osteoclast production and disruption of bone resorption (osteoclastogenesis) as well as increase bone formation by osteoblasts. Besides this, it is clear that length of **exposition to the neoplastic clone(s)** (an injury by itself) but also with the **JAK2^{V617F}:JAK2^{WT} ratio** determines the slow or rapid apparition of fibrosis in the marrow.

extracellular matrix (ECM) components, mainly collagen, in place of the normal functional tissue. If the wound quickly heals, minimum collagen deposition occurs and no scar is formed. If the injury is prolonged or repeated, extensive deposition of collagen occurs and a pathological/chronic fibrosis takes place. This is observed in virtually all organs: marrow, liver, kidney, heart, lung and gut. MF is observed in end-stage MPNs but also many other hematologic diseases and non-hematologic disorders often associated with inflammation. In MPN, fibrosis appears as a natural evolution and secondary to ET or PV (post-ET or -PV MF), as these diseases cause injury to the marrow. Such a "transformation" occurs in around 20% of patients around 20 years after the initial ET or PV diagnosis. It may also occur without apparent cause or antecedent diagnosis of ET or PV as primary MF (PMF) (previously called idiopathic MF for that reason).

MPN animal models encompass PMF, post-PV MF (PPMF) and post-ET MF (PTMF). The PV or ET caused by *JAK2*^{V617F} expression in HSC leads to secondary MF in most animals if the disease was prolonged long enough (≥6 months). In RV models, PPMF was severe (Lacout et al., 2006), moderate or absent in C57/Bl6 mice (Wernig et al., 2006) and less severe compared to BALB/c mice (Bumm et al., 2006; Wernig et al., 2006), suggesting **genetic modifiers** for fibrosis. In all models, a recurrent finding was that occurrence, speed and grading of fibrosis were correlated not only with the **length of exposition** to the neoplastic cells (injury) but also with the **JAK2^{V617F}:JAK2^{WT} ratio** (Tiedt et al., 2008; Xing et al., 2008). Interestingly, transplantation of BM from a primary recipient in the fibrotic phase resurrected a PV phenotype in secondary mice showing that the fibrosis was not due to a genetic transformation of the "seed" itself (the *JAK2*^{V617F} HSC) but rather to the progressive **seed-induced "modification" of the "soil"** (stromal cells) that does not carry a transplantable driver mutation (Zaleskas et al., 2006). Related to the *CALR*m, it has been shown that PTMF is a relatively late event (≈6 months in the RV model) and is more frequent and severe in decreasing order with the **homozygous *CALRdel52*, the heterozygous *CALRdel52* and the heterozygous *CALRins5***. A discrepancy was also observed in the location of fibrosis in the BM for one model (Li et al., 2018) and in the spleen for another (Benlabiod et al., 2020).

The **TPO^{High} model** was and remains the ultimate model of PMF or PTMF (see Section 3.1). Because of its precocity, rapidity and simplicity, this model has provided numerous information related to the physiopathology of MF. The first lesson and merit of this model were to show that a prolonged amplification and chronic stimulation of the megakaryocytic lineage

could by itself generate a disease fully mimicking PMF, making the **MK the central player in PMF**. The second lesson was to demonstrate the **pivotal role of TGF-β** in the physiopathology of MF in showing that no fibrosis (and reduced osteosclerosis) is produced in this RV model from TGF-β deficient hematopoietic donor stem cells (Chagraoui et al., 2002). This result was confirmed using TGF-β inhibitors in the TPO^{High} but also the $JAK2^{V617F}$, MPL^{W515} and GATA-1^{Low} models (Gastinne et al., 2007; Mascarenhas et al., 2014; Yue et al., 2017; Zingariello et al., 2013). MK is the major source of TGF-β in the BM and two questions remain to be answered: (1) first, as TGF-β is contained in the alpha-granules and should not be released by MKs unless a process of activation or degradation is triggered, we are left to wonder what mechanism may induce the release of TGF-β in PMF and (2) second, TGF-β is released as an inactive latent form and sequestered in the ECM, thus questioning on what might be the TGF-β activation mechanism in PMF. Thrombospondin appeared as an obvious candidate for TGF-β activation but fibrosis is normally developed from thrombospondin-deficient hematopoietic donor stem cells in the TPO^{High} model. Possible other candidates remain such as MK αvβ3 integrin or nonmyelinating Schwann cells αvβ8 integrin involved in TGF-β-induced HSC dormancy (Yamazaki et al., 2011). Interestingly, using the TPO^{High} model with **osteoprotegerin** (OPG) KO recipients, it was shown that OPG is responsible for osteosclerosis appearing at the final MF grade, through disruption of BM resorption (osteoclastogenesis) (Chagraoui et al., 2003).

TGF-β1 is the master regulator of fibrosis in particular as the main regulator of fibrosis-driving **stromal cells**. For many years the precise identity, origin and mechanism of production of these stromal cells, critical for BM fibrosis, remained an enigma. Using different MPN models, different teams described three origins of these cells. In the MPL^{W515L} RV model, neoplastic collagen- and fibronectin-producing monocyte-derived **fibrocytes** were shown to be major contributors to fibrosis, and the specific fibrocyte inhibitor Serum Amyloid P slowed down the development of fibrosis in MPL^{W515L} RV mice and increase survival in xenograft mice (Verstovsek et al., 2016). In a $Jak2^{V617F}$ model, vascular endothelial cells showed mesenchymal functional and morphologic changes through a process called **endothelial-to-mesenchymal transition** (EndMT) (Erba et al., 2017). EndMT occurs within MK proximity and MK-conditioned medium including TGF-β. More recently, using TPO-induced PMF and/or $JAK2^{V617F}$ models and genetic tracing, two groups reported the discovery

of **myofibroblasts** as fibrosis-producing cells in the BM (Decker et al., 2017; Schneider et al., 2017). Myofibroblasts are large specialized migrating contractile/secretory cells expressing a-smooth muscle actin (a-SMA) and myosin bundles and producing large amounts of collagen, glycoprotein, proteoglycan and inflammatory mediators. They are the main ECM producers. In solid organ fibrosis, these cells are well characterized (Kramann et al., 2013). In particular, they were reported to express the hedgehog (Hh) transcriptional activator Gli1 (Kramann et al., 2015). Schneider et al. showed that **Gli1$^+$ cells** are recruited from the endosteal and perivascular niche to become fibrosis-driving SMA myofibroblasts in the BM (Schneider et al., 2017). Ablation of these Gli1$^+$ cells using the diphtheria toxin receptor, abolished BM fibrosis and rescued BM failure. They validated the same pathway in human fibrosis and suggested that Gli protein could be a relevant therapeutic target. Decker et al. more recently found that BM leptin receptor (Lepr)-expressing mesenchymal stromal lineage cells expanded extensively and were the fibrogenic cells in PMF (Decker et al., 2017). These stromal cells down-regulated CXCL12 and SCF compromising HSC niche and upregulated ECM genes associated with fibrosis and osteogenesis, indicating fibrogenic conversion. They also demonstrated that **LepR1$^+$ cells** express platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRα) that is critical in the development of BM fibrosis because LepR1$^+$ cell-specific KO of PDGFRα resulted in greatly reduced reticulin fibrosis. If myofibroblast precursors became important contributors to MF, an open question remains whether the reported Gli1$^+$ and LepR1$^+$ cells overlap or whether multiple distinct myofibroblast precursors exist in the BM (Kramann and Schneider, 2018). Of note, in a *Jak2*^{V617F} TG MPN model, Arranz et al. performed lineage-tracing using Nestin-CreER^T to assess the contribution of Nestin$^+$ stromal cells (Arranz et al., 2014). No obvious contribution of these stromal cells to BM fibrosis was noted.

Additional mutations are observed in MF patients compared to ET/PV patients and animal models combining mutations with *JAK2*^{V617F} have been useful to determine which mutations are involved in fibrosis progression. It was shown that mutations of two genes encoding epigenetic regulators **EZH2**, involved in histone modification, and **DNMT3a**, involved in DNA methylation, cooperate with JAK2^{V617F} in the fibrosis process. First, three groups independently showed that EZH2 deficiency leading to decrease repressive function of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) as attested by a decreased in H3K27me3, caused increased megakaryopoiesis and platelet production at the expense of erythropoiesis in *JAK2*^{V617F} mice followed by a

strong myelofibrosis (Sashida et al., 2016; Shimizu et al., 2016; Yang et al., 2016). It is associated with an increased expression of several PRC2 target genes including ***Hmga2***, a gene activated in PMF patient $CD34^+$ cells (Guglielmelli et al., 2007), which forced expression increases megakaryopoiesis in mice (Shimizu et al., 2016). More recently CRISPR-Cas9 disruption of *Dnmt3a* in $Jak2^{V617F}$ KI HSCs blocked the accumulation of erythroid elements in BM and spleen and promoted fibrotic infiltration. Mechanistically this deletion partially mimics the loss of EZH2 with a decreased PTC2 activity, increases chromatin accessibility at active enhancers controlling the expression of pro-inflammatory genes such as *TNFα* via the NF-κB pathways (Jacquelin et al., 2018). For complement information, see the following recent review (Jacquelin et al., 2020).

4.2 Thrombo-hemorrhagic complications (Fig. 3)

Thrombosis (≈60% arterial) and hemorrhages (especially in MF) are the major causes of morbidity and mortality in MPN (12–39% in PV and 11–25% in ET) and often the initial event leading to the diagnosis (≈30% patients) so that MPN is often considered as an acquired thrombophilic disorder. The risk factors for patients are known and are the advanced age (>60 years), a prior history of thrombosis, leukocytosis, thrombocytosis (ET/MF), high hematocrit value (>45% in PV) and $JAK2^{V617F}$ allele burden (especially in ET) (Barbui and Falanga, 2016). However, due to patient heterogeneity with different risk factors and especially continuous prophylactic treatments, the physiopathology and efficacy of treatment remain difficult to investigate. While examining $JAK2^{V617F}$ animal models, were reported a high percentage of unexpected deaths with a sign of cardiac thrombosis and gangrenous bowel (Akada et al., 2010; Mullally et al., 2010). Therefore, MPN animal models became precious tools to investigate the direct role of the suspected players of these hemostasis disorders such as platelets, leukocytes, erythrocytes, endothelial cells and the driver mutations. Nevertheless, depending on the models, there were variable thrombotic and bleeding complications and to determine whether the hemostasis phenotype was associated with BM fibrosis added to the complexity of the analysis.

In accordance with previous observations in a RV model (Zaleskas et al., 2006), several investigations in 2013–2014 showed that most $Jak2^{V617F}$ mouse models displayed hemorrhage signs with an increased bleeding time. Lamrani et al. (2014) focused their studies on **platelet** functions and found

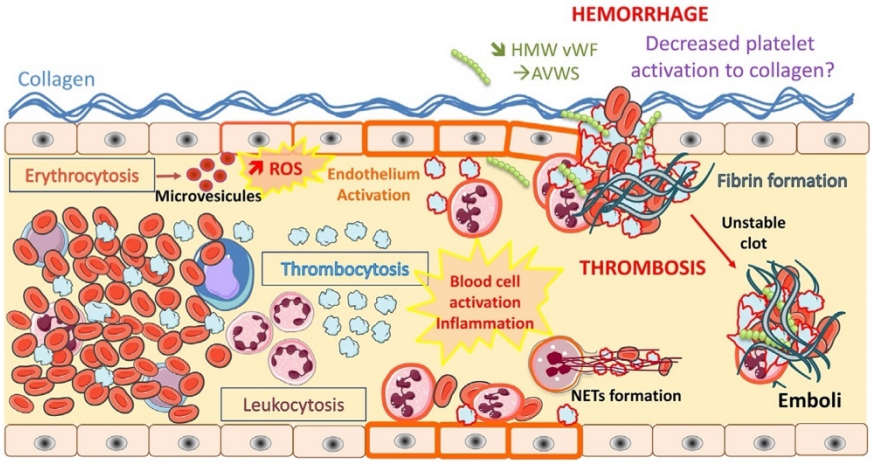


Fig. 3 Hemostasis of MPN animal models. *JAK2*^{V617F} KI animal models experiment frequent sudden and unexpected death with obvious signs of bowel and lung thrombosis or hemorrhages. In most models, an increased bleeding time is observed with an accelerated formation of unstable clots ($FeCl_3$-injury model) and embolization. Studies showed that MPN platelets present minor defects with a decreased reactivity to agonists in most models. However, thrombocytosis, concomitant to enhanced vWF proteolysis, is involved in high molecular weight (HMW) vWF polymer clearance leading to acquired vWF syndrome (AVWS). Comparison with other models showed that most hemostasis disorders are not directly caused by the *JAK2*^{V617F} mutation but rather by the full disease development with possible fibrosis but especially inflammation. Endothelial dysfunctions have been implicated with a pro-inflammatory and pro-adhesive leukocyte phenotype attributed to *JAK2*^{V617F} mutated cells, pro-inflammatory cytokines and *JAK2*^{V617F} erythrocyte-derived microvesicles increasing endothelial oxidative stress, NO pathway inhibition and vascular arterial spasms. Finally, increased propensity for NET formation, possibly due to increased neutrophils with an activated phenotype, has been shown in *Jak2*^{V617F} KI mice and linked to JAK2^{V617F} expression and thrombosis. HMW: high molecular weight, vWF: von Willebrand factor, AVWS: acquired vWF syndrome. The membrane of activated cells is highlighted in red. This figure was partially created using images from Servier Medical Art Commons Attribution 3.0 Unported License.

that PV-like *Jak2*^{V617F} KI mice (Hasan et al., 2013) are characterized by (1) a mild GPVI deficiency, (2) low platelet activation response to GPVI, CLEC-2 and thrombin receptor agonists, (3) a decreased plasma content in large von Willebrand factor (vWF) multimers known to have increased hemostatic potential and, (4) an accelerated formation of unstable clots in $FeCl_3$-injury model explaining the bleeding tendency. Overall, the study suggested that clot instability was due to enhanced vWF proteolysis with a concomitant high molecular weight (HMW) vWF polymer clearance by platelets otherwise presenting minor defects. GPVI downregulation, hemorrhage or thrombosis phenotype occurred 2 months after tamoxifen

induction in the *Scl*-CreER^{T} model demonstrating that they were not directly caused by the *JAK2*^{V617F} mutation but rather by the full disease development. Indeed, most of these events were also observed in the anemic TPO^{High} PMF model and not in an EPO-induced model of erythrocytosis, suggesting that GPVI deficiency, bleeding and acquired vWF syndrome (AVWS) may be somehow associated with fibrosis or its development. Accordingly, Matsuura et al. (2020) reported in *Vav-hJAK2*^{V617F} TG mice (Xing et al., 2008), which exhibit hallmarks of MF, a deficiency in dense granules responsible for impaired platelet secretion upon activation with collagen. Roles of leukocytes, RBCs, endothelial cells and inflammation in increased bleeding of *Jak2*^{V617F} KI mice remain to be determined. Corroborating these results, Etheridge et al., using *Tie2*-Cre/*JAK2*^{V617F} TG mice (TG mice from Tiedt et al. expressing human JAK2^{V617F} in **endothelial** and hematopoietic cells) displaying an ET/PMF phenotype, also showed attenuated arterial thrombosis after $FeCl_3$ injury and an AVWS (Etheridge et al., 2014). Transplantation experiments showed that delayed occlusion after injury required JAK2^{V617F} expression in both hematopoietic and endothelial cells arguing, in agreement with Lamrani et al. data, against the responsibility of an isolated *JAK2*^{V617F} platelet defect. Indeed, platelet-targeted expression of *Jak2*^{V617F} using the *PF4*-Cre TG mice did not lead to dysfunctional hemostasis (Etheridge et al., 2014). Interestingly, decreased clot stability was observed in *Tie2*-Cre/hu *JAK2*^{V617F}, *Vav*-Cre/hu*JAK2*^{V617F} as in *Vav*-Cre/and *Scl*-CreER^{T}/mu *Jak2*^{V617F} mice, all models displaying a PMF-like phenotype. In contrast to both studies, Hobbs et al. using the *JAK2*^{V617F} KI mouse model from Li et al., showed increased platelet reactivity to some agonists (collagen and thrombin) and decreased tail bleeding volume (Hobbs et al., 2013). Differences may be attributable to the mild ET phenotype of this model.

More recently, different teams investigated, as Etheridge et al., the role of *JAK2*^{V617F} endothelial cells in MPN hemostatic disorders as the mutation was found in these cells in patients, although at low frequencies and still the subject of controversy (Rosti et al., 2013). Rautou's team studied the role of *JAK2*^{V617F} endothelial cells in the severe presentation of patients with the Budd-Chiari syndrome that is defined as a hepatic venous outflow obstruction with liver injury and fibrosis, MPN being the leading cause (25–50%). Using a model based on *Cadherin5*-CreER^{T}/*Jak2*^{V617F} KI mice they did not find a role for these mutated endothelial cells (Poisson et al., 2018). However, the same team using the same mouse model, demonstrated that *Jak2*^{V617F} erythrocyte-derived microvesicles overexpressed myeloperoxidase increasing endothelial oxidative stress and NO pathway

inhibition and vascular hyperreactivity to vasoconstrictors (Poisson et al., 2020). Arterial spasms were reduced by the antioxidant simvastatin. More recently, Guy et al. used a *Pdgfb*-CreER^{T}/*Jak2*^{V617F} model and demonstrated that expression of the mutation in endothelial cells induced a pro-adhesive **leukocyte** phenotype due to increased expression of P-selectin and favors venous thrombosis (Guy et al., 2019). This suggests that mutation may affect the pro-thrombotic nature of endothelial cells. The phenotype was reversed by hydroxyurea. Castiglione et al. confirmed that *JAK2*^{V617F} mutation (using *Tie2*-Cre/*JAK2*^{V617F} mouse model) promotes endothelial dysfunction (Castiglione et al., 2020). This resulted in a pro-inflammatory and pro-adhesive phenotype through an upregulated expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1β) and platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM).

Leukocytosis has been linked to an increased risk of thrombosis in patients and MPN neutrophils exhibit enhanced activation. Upon stimulation, neutrophils can expel extracellular strands of decondensed DNA and produce neutrophil extracellular traps (NETs) implicated in the pathogenesis of autoimmunity and thrombosis. Ebert's team showed an increased propensity for NET formation in *Jak2*^{V617F} KI mice (Wolach et al., 2018). They also demonstrated that reduction of NET formation by a JAK1/2 inhibitor or through PAD4 inhibition reduces in vivo thrombosis in mice. Overall, they linked JAK2^{V617F} expression to NET formation and thrombosis.

Finally, several studies using animal models have implicated additional mutation found in MPNs such as deficiency or inactivating mutations in *TET2* and/or *DNMT3a* in atherosclerosis/heart failure (Fuster et al., 2017; Sano et al., 2018) through **inflammation**-associated mechanisms that may be appropriate targets for therapies, confirming data from patients (Dorsheimer et al., 2019). These results (1) are consistent with the variability of hemostatic disorders observed in MPN patients; (2) emphasize the disease phenotype, including its inflammatory components rather than the sole role of MPN mutations in the hemostatic disorders and (3) offer the opportunity to develop biomarkers and appropriated therapies in MPN to avoid one of its leading cause of morbidity.

4.3 MPN disease initiation/clonal advantage (Fig. 4)

MPNs, like cancers, progress as clonal disorders. The mutated clone(s) expand(s) in a hierarchical structure from a stem cell(s) with preserved differentiation capacities to different stages of differentiation with different

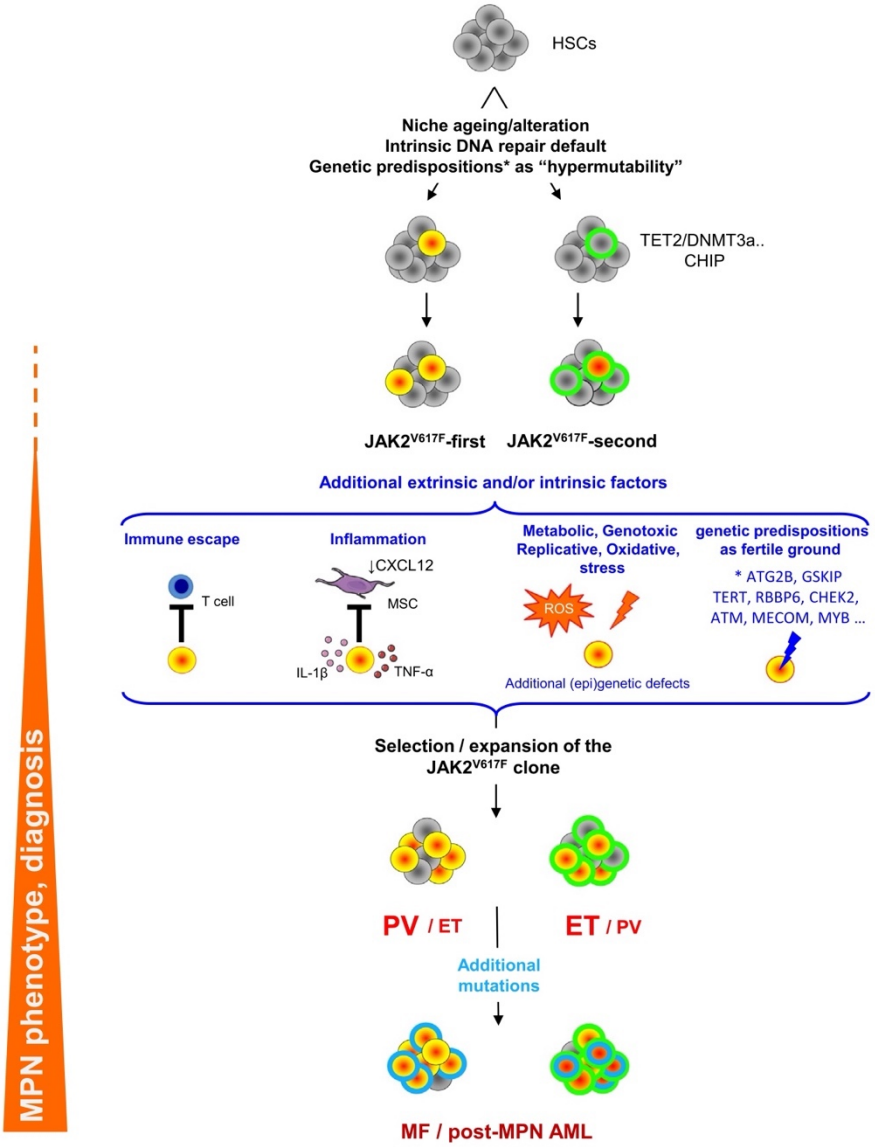


Fig. 4 MPN disease initiation. The initial JAK2^{V617F} mutation may be caused in the HSC by the niche alteration, intrinsic DNA repair defaults or genetic predispositions resulting in "hypermutability" or even induced HSC fitness change "fertile ground" (germline mutations not represented). This mutation is a common age-related mutation in clonal hematopoiesis but other mutations, such as *TET2* or *DNMT3* mutations, are more frequent and may precede the acquisition of JAK2^{V617F}. This order may modify later the MPN phenotype. At this stage, the mutated HSC may be eliminated, kept at low level without MPN diagnosis or amplified into the development of a clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). However, several lines of evidence have shown that *JAK2^{V617F}* occur several years before the MPN manifestation. Extrinsic factors, associated

(Continued)

mechanisms that endow its progeny with competitive advantages (Nguyen et al., 2012). In MPN, especially in ET and PV, the number of somatic mutations is relatively low, with sometimes only one identified isolated driver mutation. Driver mutations activate the cytokine JAK/STAT signaling pathway, explaining the strong amplification of late stages of differentiation in MPN with less amplification of the immature ones (Delhommeau et al., 2007). Therefore, the role of these mutations in clonal amplification has been seriously questioned and the importance of additional molecular events has been evaluated. The case of *JAK2*^{V617F} is iconic. Some groups noticed in animal models, a modest or no effect on the immature LSK compartment (Mullally et al., 2010) and others even impaired HSC functions with reduced self-renewal capacities (Kent et al., 2013; Li et al., 2010). These data suggested that the acquisition of this sole mutation was insufficient for clonal expansion and disease progression and may even cause a neoplastic HSC exhaustion. Other data showed that JAK2^{V617F} was capable by itself to amplify by around fourfold the pool of early progenitor cells (LSK or SLAM) (Akada et al., 2010; Hasan et al., 2013). However, all these data on clonal expansion might have been misleading because the mutation was expressed in all HSCs and not at the clonal level (TG and KI).

Using the setting of competitive transplantation, Mullally et al. showed that in a 1:4 *JAK2*^{V617F}:*JAK2*^{WT} ratio, mutated SLAMs (Lin$^-$ c-Kit$^+$ Sca-1$^+$CD48$^-$CD150$^+$) out-competed normal SLAM (Mullally et al., 2012) in contrast to another team (Li et al., 2010). We could also show that 17 *JAK2*^{V617F} SLAMs (corresponding to approximately three HSCs) in a ratio of 1/10 mutated/normal SLAMs could sustain the disease for over 6 months (Hasan et al., 2013). Finally, the group of Skoda used a single HSC (SLAM, CD34$^-$Flk2$^-$) transplantation to study whether mono clonal *JAK2*^{V617F} hematopoiesis was sufficient to induce a MPN in mice (Lundberg et al., 2014). Only a small subset of mice developed long-term reconstitution (6/113) and a MPN with exclusive erythrocytosis or

Fig. 4—Cont'd with the immune escape, inflammation, the metabolic, genotoxic, replicative or oxidative stress and intrinsic factors such as previous or additional mutations or genetic predispositions providing a "fertile ground" contribute to the expansion of the mutated clone. The role of these factors in increased JAK2^{V617F} allele burden and MPN development have been investigated and already demonstrated in animal models, such as high TNF-α and IL-1β levels for inflammation and *Tet2* or *DNMT3a* as primary/secondary mutations. The same factors, including specific mutations involving EZH2, ASXL1, *IDH1/2*, *TP53* as shown in MPN models, are involved into the evolution of PV and ET into myelofibrosis or acute leukemia transformation.

thrombocytosis. Secondary transplantation of BM from the only ET mouse did not induce either a stable reconstitution or a phenotype. This study demonstrates that a **single HSC expressing *JAK2*^{V617F} can initiate a MPN**. The low disease occurrence frequency may be due to the TG model (Tiedt et al., 2008) with an increasing huJAK2^{V617F} expression that might lead to HSC exhaustion in transplanted mice (Lundberg et al., 2014).

Recently a *PF4*-Cre/*Jak2*^{V617F} KI mouse model was described developing a full PV-like disease at 10 weeks of age from a very low number of recombined HSCs and without using deleterious irradiation or transplantation that may introduce a bias in the results (Mansier et al., 2019). A progressive amplification of all immature progenitors was observed without amplification of the HSC pool showing a minor impact of the mutation on the more immature cells but confirming *JAK2*^{V617F} HSC fitness, although possibly low, to give rise alone to MPN.

Discrepancies between results in *JAK2*^{V617F} MPN models may be linked to the fact that the mutation was either expressed as its human or mouse form, overexpressed (RV) or expressed at low levels, and the ratio between the JAK2^{V617F} and JAK2^{WT} proteins remains yet to be evaluated since no specific antibody is available. Nonetheless, the capacity of *JAK2*^{V617F} to initiate a disease by itself maybe clearly amplified or favored by intrinsic or extrinsic factors such as genetic predispositions (Bellanné-Chantelot et al., 2020; Saliba et al., 2015), metabolic reprogramming (obesity, diabetes, metabolic diseases) (Faubert et al., 2020), inflammation/immunity (Greten and Grivennikov, 2019; Grivennikov et al., 2010), additional mutations (*TET2*, *DMNT3A*), microenvironment or aging.

In the first instance, as discussed later, several genetic defects such as ***DNMT3a* loss** (Challen et al., 2011) or ***TET2* loss** (Moran-Crusio et al., 2011), cooperate with *JAK2*^{V617F} to amplify its ability for clonal expansion (Chen et al., 2015; Jacquelin et al., 2018; Kameda et al., 2015). These epigenetic defects involved in HSC fitness are also the most common age-related mutations in clonal hematopoiesis with *JAK2*^{V617F} (Busque et al., 2012; Jaiswal et al., 2014; Xie et al., 2014), comforting the hypothesis that *JAK2*^{V617F} is also an early initiating event for MPN. *DNMT3a* mutations and *TET2* loss often precede but may also follow *JAK2*^{V617F}, this order influencing the phenotype as shown by Green's group for *DNMT3a* (Nangalia et al., 2015) and for *TET2*, to induce when first an ET and when second a PV, in young age with high risks of thrombocytosis (Ortmann et al., 2015). Following *JAK2*^{V617F}, these mutations may have occurred through the genetic instability generated by *JAK2*^{V617F} mutation

as it was shown in mice to mediate a decrease in the detoxifying enzyme catalase resulting in an increase of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress leading to DNA damages (Marty et al., 2013).

Extrinsic factors seem to favor MPN disease development. Indeed, it was shown that gene dysregulations leading to PTPN11 phosphatase activation or IκBα or Rb loss, could promote the development of a myeloproliferative disorder (although not a MPN per se) in mice through interaction with the BM microenvironment (Dong et al., 2016; Rupec et al., 2005; Walkley et al., 2007). Arranz et al. demonstrated that BM **Nestin$^+$ mesenchymal** stem cells were reduced in *JAK2*^{V617F}-mutated mice due to BM neural damage and Schwann cell death caused by IL-1β produced by mutant HSCs (Arranz et al., 2014). The in vivo depletion of Nestin$^+$ cells induced the expansion of mutated HSCs and the progression of the MPN phenotype. Very recently, **IL-1β deficiency** was shown to reduce the MPN phenotype of the engraftment of *JAK2*^{V617F} TG BM cells in competitive experiments with WT cells, demonstrating that IL-1β, produced by the *JAK2* mutated cells, favors early clonal expansion and is required for optimal MPN disease initiation. Rai et al. demonstrated that IL-1β secreted from *JAK2*^{V617F}-mutated cells is involved in early clonal expansion and is necessary for MPN disease initiation (Rai et al., 2019). Moreover, Tyner et al. (2010) observed an increase in tumor **TNFα levels** in a *JAK2*^{V617F} RV model that was confirmed in patients by Fleischman et al. (2011). The authors were able to show that TNFα promotes the clonal expansion of *JAK2*^{V617F} cells in a *JAK2*^{V617F} RV model using *TNFα*$^{+/+}$ or *TNFα*$^{-/-}$ donor cells. Hosts grafted with *TNFα*$^{-/-}$ BM displayed reduced splenomegaly and a loss of the competitive advantage over *JAK2*^{WT} cells in the spleen and BM. Interestingly, *JAK2*^{V617F}-*Dnmt3a*-Cas9 LSKs with increased competitive advantage showed a strong enrichment of inflammatory pathways, and specifically of TNFα (Jacquelin et al., 2018).

Due to its relatively recent discovery, the capacity of ***CALRm*** to provide clonal selection has been less investigated. However, *CALRm* patients generally reach a higher allele burden in granulocytes at diagnosis and develop a MPN disease approximately 10 years earlier than *JAK2*^{V617F} patients, suggesting that *CALRm* induce a stronger clonal advantage than *JAK2*^{V617F} (Rumi et al., 2014). Different studies on RV, TG and KI models showed that *CALRm* induces an increased frequency of HSCs in the BM but also in the spleen (Benlabiod et al., 2020; Li et al., 2018; Marty et al., 2016; Shide et al., 2017; Toppaldoddi et al., 2019). Contrary to *JAK2*^{V617F}, which gives a competitive advantage in later stages of hematopoiesis

(Delhommeau et al., 2007; Scott et al., 2007), *CALRm* seems to give an early competitive advantage at the HSC level especially for type 1 mutations (Marty et al., 2016; Toppaldoddi et al., 2019). Indeed, using engraftment studies, Benlabiod et al. showed that both *CALRdel52* and *CALRins5* induced a competitive advantage over the WT cells but only *CALRdel52* induced an increase in proliferation of HSCs (Lin^- c-Kit^+ $Sca\text{-}1^+$ $CD48^-CD150^+$) (Benlabiod et al., 2020). However, other competitive engraftments using constitutive KI models revealed a low competitive advantage of mu*CALRdel52* and *CALRdel19* cells that was not preserved in serial transplantation assays (Balligand et al., 2020; Shide et al., 2019). Moreover, Li et al. demonstrated that homozygous *CALRdel52* cells had no competitive advantage over the WT cells in peripheral blood (Li et al., 2018). The difference between these models and Benlabiod et al. study might be explained by different engraftment strategies. Benlabiod et al. grafted floxed-cells expressing a WT phenotype and induced the KI after the engraftment, contrary to Li et al., Balligand et al. and Shide et al. who transplanted already induced BM cells expressing a *CALRm* phenotype. This could suggest that CALRm-expressing cells might display a homing or an HSC function defect. The results from Benlabiod et al. also correlated with what was found in patients by El-Khoury et al. who demonstrated that *CALRm* was associated with clonal dominance at the HSC level (El-Khoury et al., 2020).

In the next part, we will discuss the role of additional mutations in the selection of the mutated clone and the impact on the MPN phenotype.

4.4 Role of additional mutations

MPNs, and in particular MF, are heterogeneous disorders. In mice, as mentioned earlier, $JAK2^{V617F}$ models generate ET and/or PV evolving, in most of cases, into MF. No genetic event responsible for this "natural" and possibly clonal evolution has been characterized; as mentioned before a PV phenotype resurrects from a fibrotic BM transplantation (Zaleskas et al., 2006), and also polyclonal hematopoiesis in MF phase was observed as in PV phase (Lacout et al., 2006). Therefore, modifications or wound/scar of the microenvironment by the MPN clone seem to be responsible for the evolution toward MF in MPN animal models. Concerning the evolution of MPN into AML, there is no report describing the transformation of $JAK2^{V617F}$ or *CALRdel52* models into a blastic crisis, except in the TPO^{High} model (Villeval et al., 1997). In humans, additional mutations are mainly found in MF and post-MPN leukemic patients, facilitating the progression of MPN into MF or AML.

ARTICLE IN PRESS

These additional mutations are also found in other myeloid malignancies, especially MDS and they affect genes encoding **epigenetic regulators** (TET2, ASXL1, DNMT3A, EZH2, IDH1/2), components of the **splicing machinery** (SF3B1, SRSF2, U2AF1, others) and **transcriptional factors** such as p53. In humans, these mutations are acquired before or after the phenotypic drivers and may correspond to an age-related clonal hematopoiesis modifying the fitness of the *JAK2/CALR/MPL*-mutated clone or to a predisposition. They may also modify the disease phenotype by favoring disease progression. Mutations in a set of five genes, namely *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2* and *IDH1/2* have been associated with poor PMF prognosis (reduced overall survival and increased risk of leukemic transformation) (Vannucchi et al., 2013). The most frequent mutations associated with $JAK2^{V617F}$ post-MPN AML are *ASXL1*, *IDH2*, *SRSF2* and *TP53* mutations, *ASXL1* and *SRSF2* mutations being also often associated with $JAK2^{V617F}$-negative post-MPN AML (Rampal et al., 2014).

Several mouse models have been developed combining $JAK2^{V617F}$ to these mutations in order to assess and demonstrate their contribution to the disease. We will not address mutations of the splicing machinery or transcriptional factors, such as RUNX1 and NF-E2, as compound mice have yet to be generated.

4.4.1 Alteration of the epigenetic landscape of MPN clones (Shih et al., 2012)

4.4.1.1 *EZH2* mutations

Several mutations in the polycomb repressive complex 2 (PRC2) components have been identified in myeloid malignancies but *EZH2* mutations are by far the most frequently found in MPNs. EZH2 is the catalytic subunit of PRC2 (H3K27me3). Both heterozygous and homozygous mutations of *EZH2* have been identified in ET but mostly in MF patients. They have been identified as the first genetic lesion, preceding both $JAK2^{V617F}$ and *CALRm*. Most of these *EZH2* mutations result in the truncation of the protein predicting a loss-of-function (Ernst et al., 2010). Three teams investigated the result of conditional loss of *Ezh2* in $JAK2^{V617F}$-driven MPN models. Floxed *Ezh2* KO mice were crossed with conditional murine $Jak2^{V617F}$ KI mouse (Yang et al., 2016) or with two different human $JAK2^{V617F}$ TG models (Sashida et al., 2016; Shide et al., 2008; Shimizu et al., 2016). Concomitant induction of $Jak2^{V617F}$ and *Ezh2* KO by Yang et al. resulted in the promotion of megakaryopoiesis at the expense of erythropoiesis with an accelerated **progression to MF** and an increase **clonal advantage** of HSCs. The modification of the $Jak2^{V617F}$-induced phenotype

was dependent on the de-repression of EZH2 target genes involved in megakaryopoiesis (*S100a8*, *S100a9*, *Ifi2712a*, *Hmga2*) due to decreased H3K27me3 levels. Concomitant induction of $Jak2^{V617F}$ expression by the group of Skoda with tamoxifen and deletion of one or both *Ezh2* alleles resulted in a more pronounced phenotype evolving to MF with the heterozygous deletion or MF with the homozygous deletion suggesting that the severity of the phenotype was dependent on the amount of residual EZH2. In accordance with the other studies, they showed a **shift of erythropoiesis toward megakaryopoiesis**. Single HSC engraftments suggested a predominant role for *EZH2* loss in the initiation of the $JAK2^{V617F}$ disease with a synergistic increase in HSC self-renewal. Gene expression analysis of LT-HSCs and MEPs revealed an increased expression of genes linked to self-renewal (including *Hmga2*), proliferation, megakaryopoiesis and MF due to sub-representation of H3K7me3 marks on their promoters. The group of Iwama used transplantation to restrict to hematopoietic cells the expression of $JAK2^{V617F}$ and a tamoxifen-inducible *EZH2* deletion under the control of ubiquitin promoter (Sashida et al., 2016). They obtained very similar results than previously described with transcriptional program modifications including also a de-repressed expression of *Hmga2*. The MF-initiating capacity of $JAK2^{V617F/+}/Ezh2^{-/-}$ cells was inhibited with a bromodomain inhibitor that reduces H3K27ac levels at the promoter regions of PRC2 targets and down-regulated their expression.

Taken together, these studies showed that loss of *EZH2* drives clonal hematopoiesis and promotes the rapid progression of the $JAK2^{V617F}$ disease toward MF with **de-repression of *Hmga2***. When upregulated, HMGA2 led to a faster and more severe transplantable $JAK2^{V617F}$ MPN with anemia due to apoptosis of erythroblasts in mice (Ueda et al., 2017).

4.4.1.2 *TET2* mutations

In contrast to other epigenetic regulators, mutations of *TET2* are commonly associated with either of the MPNs and not specifically with MF. TET2 is a dioxygenase that catalyzes the conversion of 5-methyl-cytosine (5-mC) associated with low gene expression into 5-hydroxymethylcytosine (hmC), an intermediate toward demethylation of cytosine and gene expression. Heterozygous and homozygous inactivating *TET2* mutations and deletions are frequently associated with PV and MF $JAK2^{V617F}$ MPNs and may appear before or after $JAK2^{V617F}$ acquisition. *TET2* mutations

do not clearly impact MPN prognosis may be owing to when the mutation occurs (early or in a full-bloomed MPN), but have been associated with leukemic transformation. Delhommeau et al. showed in immunodeficient mice that the *TET2*-mutated/JAK2^{V617F} clone was associated with an increase clonal advantage at the early and committed progenitor levels (Delhommeau et al., 2009). *Tet2* KO mice have a marked expansion of myeloid-biased HSCs and progenitor cells and present an impaired myeloid differentiation, an increase of immature lymphoid cells, splenomegaly associated with extramedullary hematopoiesis and developed a CMML-like disease (Moran-Crusio et al., 2011; Quivoron et al., 2011). *Tet2*$^{+/-}$ mice had a similar phenotype than *Tet2*$^{-/-}$ mice. *Tet2* loss was found to accelerate the *JAK2*^{V617F}-driven MPN phenotype and **increased clonal dominance of HSCs** in the *Vav*-Cre compound *Jak2*^{V617F}*Tet2*^{null} mice of Chen et al. (2015). In particular, a HSC self-renewal signature was enriched in the GSEA analysis of both *Jak2*V617F/*Tet2*null and *Tet2*^{null} mice compared to *Jak2*^{V617F} model. Kameda et al. (2015) crossed their *Jak2*^{V617F} TG mice with an engineered *Tet2*$^{trap/trap}$ model that has residual *Tet2* mRNA (Shide et al., 2012). To overcome the early post-natal lethality of *Tet2*$^{trap/trap}$ mice, authors chose to engraft fetal livers in recipient mice that developed a worse MPN (MF) than mice engrafted with *Jak2*^{V617F} fetal livers alone, with poor survival and an expansion of LT-HSCs. In serial transplantations, the progressive disadvantage conferred by *Jak2*^{V617F} was defeated by the reduction of TET2 level that allowed sustaining MPN, suggesting that it restores the self-renewal defect due to JAK2^{V617F} in this model. In all these mouse models, *TET2* loss worsens *JAK2*^{V617F}-induced phenotype and increases the self-renewal capacity of HSCs and their expansion.

4.4.1.3 *DNMT3A* mutations

DNMT3A catalyzes the de novo demethylation of CpG islets leading to gene inactivation. Heterozygous mutations are more associated with PMF (≈15%) than PV and ET (≈5%) (Abdel-Wahab et al., 2011). *Dnmt3a* KO mice present a major expansion of HSC with increased self-renewal (Challen et al., 2011). One model has been generated combining *Jak2*^{V617F} with *Dnmt3a* loss using the CRISPR-Cas9 technology into *Jak2*^{V617F} KI mice (Jacquelin et al., 2018). Both events cooperate to favor a rapid progression of PV to lethal MF accompanied by **increased HSC self-renewal**.

4.4.1.4 *IDH1/2* mutations

IDH1/2 are two isoforms of the Krebs cycle enzyme that catalyzes the decarboxylation of isocitrate to alpha-ketoglutarate. Mutations are associated with PMF and affect the methylation of DNA via the depletion of alpha-ketoglutarate (necessary for TET2 and other demethylases) and predict a poor MPN outcome and reduced leukemia-free survival. With the hope of investigating the role of IDH1/2 to promote the transformation of $JAK2^{V617F}$-MPNs, the group of Levine crossed $Jak2^{V617F}$ KI mice shown to display a mild phenotype without MF (Mullally et al., 2010) with conditional hu$IDH1^{R132H}$ or mu$Idh2^{R140Q}$ with *Mx1*-Cre (McKenney et al., 2018). Six-month-old compound mice were studied and showed a PV-like phenotype with leukocytosis and splenomegaly resembling $Jak2^{V617F}$ mice and concomitant elevated 2-hydroxyglutarate compared to *Idh1/2* mutated mice. Mouse MPN progressed to a **pre-leukemic stage** and was transplantable from the LT-HSC compartment that was expanded. Phenotype with $IDH1^{R132H}$ was milder than with $Idh2^{R140Q}$. Phenotype (and spleen blasts) regressed with a combination of JAK2 and IDH2 inhibitors. Interestingly, treatment reverses extramedullary hematopoiesis and the leukemic signature that was highlighted in *Vav*-Cre/$Idh1^{R132H}$ mice (Sasaki et al., 2012).

4.4.1.5 *ASXL1* mutations

ASXL1 mono-ubiquitinylates the DNA packaging protein histone H2A (H2AK119ub1).

Frameshift and nonsense *ASXL1* mutations are of equally poor prognosis in $JAK2^{V617F}$ than in type 2 *CALRm* MPNs. In contrast, when associated with type 1 *CALRm* they have not this poor prognosis. *Asxl1* KO is embryonic lethal peri-birth in a fraction of animals (Fisher et al., 2010; Wang et al., 2014). Survivors show a slight reduction in myeloid and erythroid progenitors and moderate splenomegaly. In contrast, Wang et al. showed also significant features of MDS and a reduced progenitor cell pool. In a recent conditional model using *Mx1*-Cre and *Vav*-Cre, Abdel-Wahab et al. (2013) confirmed these results and further studied the effect of *Asxl1* loss on hematopoiesis after birth. Mice developed a severe and rapid pancytopenia and myelodysplasia due to impaired progenitor differentiation. Mice presented an increased number of HSC and progenitor cells but **impaired self-renewal** characterized by the competitive disadvantage in serial transplantation. When crossing $Asxl1^{+/-}$ mice with $JAK2^{V617F}$ TG mice (Guo et al., 2019; Xing et al., 2008) disease **progression to MF** was accelerated and a few mice developed myeloid leukemia.

ARTICLE IN PRESS

Intriguingly, Inoue et al. demonstrated that similar phenotypes were developed by both *Asxl1* KO and RV overexpression of mutant ASXL1, suggesting that these mutations might rather be dominant-negative and/or gain-of-function (Inoue et al., 2013, 2016). Following these observations, several groups developed *Asxl1*-mutated KI models with various effect on hematopoiesis including a decrease in the number and self-renewal of HSCs and age-dependent myelodysplasia and splenomegaly (Hsu et al., 2017; Uni et al., 2019). Similarly, two other models presented dysplastic features and increased susceptibility for leukemic transformation/age-related MPN, MDS and AML but opposed effects on HSCs with impaired numbers (Nagase et al., 2018) or increased HSC self-renewal and myeloid bias (Yang et al., 2018). Thus, in the future, it will be interesting to combine $JAK2^{V617F}$ with *ASXL1* mutations rather than with *ASXL1* deletion to study hematopoiesis.

Taken together, these studies were important to characterize these additional mutations when they are first events as drivers of clonal hematopoiesis due to the increase in HSC self-renewal, maybe at the exception of *ASXL1* mutations. As a second event, they accelerate the degree of malignancy of the already developed MPN and act as phenotypic modifiers. Some studies have documented that *CALRm* are most of the time the first genetic lesion suggesting that additional mutations may rather play a role in disease progression instead of initiation in these cases.

4.4.2 Alterations in transcription factors

4.4.2.1 p53

TP53 is a tumor suppressor gene. Mutations have been associated with transformation into secondary post-MPN AML (50% of cases) as well as de novo AML. At the chronic MPN stage *TP53* mutations are usually mono-allelic and with a very low allele frequency (VAF), not always proved as loss of function and mostly associated with PMF. Transformation to AML is associated with bi-allelic *TP53* mutations and increased VAF. Two groups studied the effects of combining $JAK2^{V617F}$ and *TP53* loss in mice using the same approach. They engineered a RV model where p53-null BM was transduced to express $Jak2^{V617F}$ and engrafted in either WT or $Tp53^{-/-}$ recipient mice (Rampal et al., 2014; Tsuruta-Kishino et al., 2017). In both studies, mice developed a PV shortly followed with **progression to leukemia** and a drastically reduced median survival after BMT between 46.5 and 110 days, respectively. Mice showed an expansion of progenitors (especially of erythroid progenitors), MEPs and HSCs possessing leukemia-initiating capacity as shown by the shortened latency to develop

leukemia with serial transplantations. The cooperativity between the two genetic events was also highlighted by the increased self-renewal capacity of committed progenitors in replating assays. Moreover, the group of Kurokawa demonstrated that *Tp53* heterozygosity had no impact on the JAK2^{V617F}-induced PV, confirming that the passage from the chronic phase to AML is mostly dependent on the gain of *TP53* homozygosity (Tsuruta-Kishino et al., 2017).

In aggregate, compound mouse models have helped to understand the role of additional mutations in MPN. They show that these additional mutations rarely cause a myeloproliferation by themselves. However, they may increase self-renewal of HSCs helping disease initiation through the expansion of the *JAK2*^{V617F} clone and probably of the *CALR*-mutated clone (*TET2*, *EZH2*, *DNMT3a*). Some promote myelofibrosis (EZH2, DNMT3a, ASXL1) or acute leukemic transformation (*ASXL1*, *IDH1/2*, *TP53* loss). Importantly, these mutations can be co-associated suggesting that it might be necessary to generate more complex mouse models to understand the interrelationships between them in MPN.

4.5 Deciphering the mechanisms responsible for the MPN phenotype

Mouse models have been helpful in determining that driver mutations were responsible for the occurrence of MPN and that their oncogenic properties were all dependent on the activation of the JAK2/STAT signaling pathway. Mouse models were further used to decipher the mechanisms contributing to disease pathogenesis, in particular how *JAK2*^{V617F} could cause different disease phenotypes, by evaluating the contribution of specific organs, partners (cytokines and their receptors) and signaling pathways.

4.5.1 Role of the spleen

As mentioned before, the spleen does not play the same role in mice and men. Therefore, one must be careful in evaluating the role of the spleen in a mouse model of MPN. With this caveat, splenomegaly in patients still results from extramedullary hematopoiesis and is a major clinical manifestation of MPNs. Moreover, the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib can be a safer alternative to splenectomy as it significantly reduces spleen size. A study was conducted in 2009 by Mo and colleagues using a RV *Jak2*^{V617F} PV model demonstrated that splenectomy normalizes the hematocrit in mice (Mo et al., 2009). However, disease burden, fibrosis and osteosclerosis develop normally in the marrow of these mice. Interestingly, the hematocrit

ARTICLE IN PRESS

was only slightly blunted in an EPO-induced secondary polycythemia model suggesting that the spleen was specifically required for the polycythemia induced by *JAK2*^{V617F}. Obviously, the role of the spleen in human PV is not the same, underlying the differences between the MPN pathogenesis of the two species. Splenectomy in MF patients is a potential therapeutic option. However, this surgery can be associated with a decrease in overall survival (Santos et al., 2014) in addition to transformation to AML (Barosi et al., 1998; Morel et al., 2010).

4.5.2 Importance of MPL

It has been shown in cell lines that the expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2^{V617F}-mediated transformation and signaling activities (Lu et al., 2005) and MPL is the only one being essential for HSC maintenance making it a good candidate for MPN disease initiation and development. Using *JAK2*^{V617F} TG mice developing ET (Tiedt et al., 2008), Sangkhae et al. demonstrated that *JAK2*^{V617F}/*Mpl*$^{-/-}$ mice remained thrombocytopenic with normal neutrophil counts and spleen weight and a profound HSC pool deficiency while *JAK2*^{V617F}/*Mpl*$^{+/-}$ mice with reduced expression of MPL developed an attenuated MPN with slightly elevated platelet and neutrophil counts and a rescue of the normal HSC pool. Therefore, the presence of MPL but also its level is required for the full development of MPN making MPL a good therapeutic target. They also found that TPO was not crucial for the development of MPN (Sangkhae et al., 2014). Of note, further investigation is still necessary to see if MPL is required for the full development of PV and MF using another mouse model with an inducible *Mpl*$^{-/-}$.

In order to study the implication of MPL in *CALRm*-mediated thrombocytosis in mice, Marty and colleagues used *c-mpl*- and *tpo*-deficient mice to show that MPL, but not TPO, was essential for CALR mutant to induce thrombocytosis in a RV mouse model (Marty et al., 2016). This study demonstrates that like other driver mutations, *CALRm* induces MPN via the activation of the cytokine receptor/JAK2/STAT signaling pathway. Moreover, this experiment confirmed in vitro data demonstrating that *CALRm* tropism (ET/PMF) was linked to the specific activation of MPL by CALR mutants, while JAK2^{V617F} can bind and activate EPOR, MPL and the G-CSFR. Balligand and colleagues also assessed the importance of MPL signaling in the development of *CALRm*-mediated ET. They crossed heterozygous *Calrde52* KI with mice expressing MPL$^{\Delta 60/\Delta 60}$ missing part of the receptor cytoplasmic tail crucial for signaling.

Resulting mice did not develop thrombocytosis, highlighting the importance of MPL signaling in *CALRm*-induced pathogenesis (Balligand et al., 2020). Interestingly, *CALRm* KI mouse models were found to develop an unexpectedly mild phenotype compared to heterozygous human counterparts. They demonstrated that the chimeric CALRdel52 and CALRins5 proteins (murine backbone with human mutated C-terminal part) were less efficient in activating muMPL than huMPL and that treating these mice with the MPL agonist Romiplostim increased the severity of the disease suggesting that the mild phenotype was linked to a sub-optimal stimulation of muMPL in the KI mouse models (Benlabiod et al., 2020).

These results demonstrate how MPN, driven by gain-of-function mutations of the JAK2/STAT pathway relied on JAK2-dependent MPL signaling for HSC maintenance.

4.5.3 Role of zygosity

In MPN patients, *JAK2*^{V617F} heterozygosity is mostly associated with an ET phenotype whereas homozygosity, resulting from mitotic recombination of chromosome 9p (acquired uniparental disomy or aUPD), is more frequent in PV and MF patients (Perrier et al., 2005; Tiedt et al., 2008). **Loss of heterozygosity** has rarely been observed in *Jak2*^{V617F}-mutated mice models. Marty et al. characterized the development of 14% of homozygous KI clones in a heterozygous *Vav*-Cre/*Jak2*^{V617F} KI mouse model due to either homologous recombination as found in MPN patients or to the deletion of the *WT* allele (Marty et al., 2013). The group of Mohi demonstrated that loss of the *Jak2*^{WT} allele in mice increased the severity of the phenotype with an acceleration of MF suggesting that it acts as a **negative regulator** of the *Jak2*^{V617F} allele (Akada et al., 2014). The group of Skoda using an inducible *Jak2* KO model corroborated this result. Deletion of the *WT* allele worsens erythrocytosis (but not leukocytosis and thrombocytosis) and reduced survival of a *Vav*-Cre/*Jak2*^{V617F} TG model, strengthening the link between the WT:V617F JAK2 ratio in the responsiveness of erythropoiesis to JAK2^{V617F} (Kubovcakova et al., 2013). Finally, the group of Green showed that homozygosity in their *JAK2*^{V617F} KI mice resulted in a phenotypic switch from ET to PV and increasing defects in HSC (Li et al., 2014).

Related to *CALRdel52* and *CALRins5* KI mouse models, disease phenotype was also more severe in the homozygous context (Benlabiod et al., 2020; Li et al., 2018). Moreover, to study the role of *CALRins5* homozygosity in the severity of disease development they performed competitive engraftment of 20:80% of homozygous: heterozygous *CALRins5* BM cells

into lethally irradiated recipient mice. These mice developed higher thrombocytosis than mice grafted with 100% heterozygous *CALRins5* BM and, interestingly, with 100% heterozygous *CALRdel52* BM cells. Considering that homozygosity is more frequent in *CALRins5* patients, these observations provided a possible explanation for the apparent discrepancy between higher platelet counts found in *CALRins5* compared to *CALRdel52* ET patients and mouse data where thrombocytosis if higher in heterozygous *CALRdel52* compared to heterozygous *CALRins5* KI mice. Six months after KI expression induction, they observed that homozygous *CALRins5* HSCs (SLAM) were able to take the advantage over the heterozygous cells. In contrast, Balligand and colleagues were unable to generate homozygous *Calrdel61* and *Calrdel52* mice using their constitutive KI models as homozygosity reproduced the lethal phenotype of endogenous *CalrWT* KO for heart development (Balligand et al., 2020; Mesaeli et al., 1999). Taken together, gene-dosage hypothesis for *JAK2*^{V617F} as for *CALRm* linked to the strength of JAK2 signaling seems to be verified, as homozygosity induces in both cases a more severe MPN phenotype.

4.5.4 Role of STATs in JAK2^{V617F}-induced disease phenotype heterogeneity

When EPO, TPO and G-CSF ligand bind to their respective receptors, JAK2 is activated by auto and trans-phosphorylation before phosphorylating some key tyrosine residues in the cytoplasmic tails of the receptors. These phosphorylated tyrosine residues serve as anchors to recruit signaling molecules such as the STAT1/3/5 that get phosphorylated by JAK2 and translocate to the nucleus to activate target genes. *JAK2*^{V617F}, *CALRm*, and *MPL*$^{W515L/K}$ mutations lead to the constitutive activation of the JAK2/STATs pathway. The individual implication of the different STATs in MPN pathogenesis has been evaluated in mice. The hypothesis was that the heterogeneity of *JAK2*^{V617F}-induced MPN phenotype might be due in part to gene dosage and the strength of JAK2 signaling but also to STAT qualitative implications in signaling.

In humans, Teofili et al. showed that different p-STAT3/5 status are linked to different phenotypes: high p-STAT3/5 to PV, high p-STAT3 and low p-STAT5 in ET and low p-STAT3/5 in MF (Teofili et al., 2007). E. Chen and colleagues showed that increased STAT1 activity produced a *JAK2*^{V617F} ET phenotype when the downregulation of STAT1 activity in ET-progenitors produces a PV phenotype (Chen et al., 2010). In mice, defective megakaryopoiesis of *Gata-1*^{low} mice is rescued by

STAT1 ectopic expression while *Stat1* KO mice display defective MK polyploidization (Huang et al., 2007).

To unravel the contribution of the STAT1/3/5 family members in MPN phenotypes, KO mice of the *Stat* family were crossed with $JAK2^{V617F}$ mouse models. Duek and colleagues showed that in $JAK2^{V617F}$/$Stat1^{-/-}$ mice thrombocytosis was reduced in favor of erythropoiesis, which led to the conclusion that activation of IFNγ/**STAT1** signaling promotes megakaryopoiesis and is involved in $JAK2^{V617F}$-induced ET phenotype (Duek et al., 2014). However, later, Grisouard et al. crossed *Stat1* KO mice with *JAK2 exon12* TG mice (displaying a PV phenotype) and found that these mice had no change in platelet and red cell parameters (Grisouard et al., 2016) driving the conclusion that STAT1 activation is not an essential mediator of *JAK2 exon12*-dependent erythropoiesis, in contrast to the one of $JAK2^{V617F}$-driven phenotype.

The role of **STAT3** was also investigated using a double $JAK2^{V617F}$/$Stat3^{fl/fl}$ mouse model (Grisouard et al., 2015). These mice have an increased platelet count and reduced overall survival. One hypothesis was that the deletion of *Stat3* may trigger the expression/activation of STAT1 due to a compensation mechanism between STAT1 and STAT3 (Regis et al., 2008). In another study, Yan and colleagues used $JAK2^{V617F}$/*Stat3*-deficient mice and found that the deletion of STAT3 increased platelet counts, enhanced the expansion of progenitor and myeloid precursor cells and enhanced the severity of MPN (Yan et al., 2015). The latter observation suggests that STAT3 has a negative role in $JAK2^{V617F}$-induced PV.

The effect of **STAT5** deficiency in the pathogenesis of MPN has been studied by two teams using two different $JAK2^{V617F}$ mouse models. D. Yan and colleagues crossing conditional $Jak2^{V617F}$ KI and floxed *Stat5*-deficient mice showed an inhibition in the development of PV, normal blood parameters and the absence of splenomegaly with a rescue of the PV phenotype upon re-expression of STAT5 (Yan et al., 2012). Walz et al. showed that $JAK2^{V617F}$ RV expression in *Stat5a/b*-deficient mice failed to induce polycythemia but the loss of STAT5 did not prevent the development of MF at the opposite of Yan et al. data (Walz et al., 2012). This shows that STAT5 is crucial for the development of PV and possibly prevent or delay fibrosis transformation. However, unexpectedly giving the importance of Stat5 for $Jak2^{V617F}$ MPN, no increase in Stat5 was observed in *JAK2exon12* TG mice (Grisouard et al., 2016).

4.5.5 Metabolic alterations

Only one study was conducted on the role of JAK2^{V617F}-dependent metabolic alterations in MPN most notably focusing on the increased need for energy, which is one of cancer hallmarks. To study this, Rao and colleagues compared WT mice and conditional TG mice expressing either *JAK2*^{V617F} or *JAK2 exon12* (Rao et al., 2019). Authors showed that *JAK2* mutations increase glycolysis and oxidative phosphorylation leading to hypoglycemia correlated with the exacerbated erythropoiesis. A high-fat diet in contrast to a high-glucose diet (not correcting hypoglycemia) improved the erythroid MPN phenotype. Chemical suppression of glycolysis normalized glucose level, increased reactive oxygen species (ROS) and decreased hemoglobin and leukocytosis. Thus, metabolic alterations are implicated in worsening the disease, leading to complications such as atrophy of the adipose tissue and a decreased overall survival.

4.5.6 Reactive oxygen species in the pathogenesis of MPN

C. Marty and colleagues were the first to show that *JAK2*^{V617F} induces an accumulation of ROS in mice (Marty et al., 2013). Increase ROS levels were partly due to a decrease in the detoxifying enzyme catalase and were demonstrated to be involved in JAK2^{V617F}-induced genetic instability and the loss of heterozygosity. Furthermore, the accumulation of ROS was significantly higher in immature cells (LSK), compared to more engaged cells, suggesting a potential role in clonal advantage.

4.5.7 Changes in iron metabolism caused by JAK2 exon12 mutation

PV patients carrying the *JAK2 exon12* mutation usually present with an isolated erythrocytosis, characterized by a persistent increase of red cell mass and hematocrit. Grisouard and colleagues showed that the inducible TG mice expressing a human *JAK2 exon12* mutation had isolated erythrocytosis due to modifications in the iron metabolism, including decreased expression of hepcidin and increased expression of transferrin receptor-1 and erythroferrone, making iron more available for maximal production of red blood cells (Grisouard et al., 2016).

4.6 Preclinical mouse MPN model studies, two iconic examples

Mouse MPN models have been extensively used in preclinical studies to test numerous drugs, as elegantly reviewed elsewhere (Bartalucci et al., 2013).

Thus, we chose to focus on JAK inhibitors and interferon-alpha as a proof-of-concept. These extensive preclinical studies have demonstrated the validity of MPN mouse models for the evaluation of drug efficacy or inefficacy.

4.6.1 JAK2 inhibitors

The first JAK2 inhibitor tested in mice was Fedratinib (formerly TG101348/SAR302503 and recent trade name Inrebic). Wernig et al. showed that Fedratinib reduced hematocrit and leukocyte counts as well as the splenomegaly in a *Jak2*^{V617F}RV mouse model (Wernig et al., 2008). Debeurme et al. compared the effects of Fedratinib in two models, a *Jak2*^{V617F} KI with a PV phenotype and PPMF and a TPO^{High} mouse model with PTMF. This study showed that Fedratinib reduced the erythroid hyperplasia and splenomegaly without reducing the mutant allele burden like previous studies (Mullally et al., 2010) but also normalized WBC and hematocrit levels and even in the thrombocytopenic PPMF model prevented the development of MF and increased platelet counts in contrast to the severe PTMF model (Debeurme et al., 2015). Fedratinib as Inrebic was FDA approved for the treatment of MF. Ruxolitinib (formerly INCB018424) is a JAK1/2 inhibitor and has been tested in many mouse models (Kubovcakova et al., 2013; Quintás-Cardama et al., 2010). In 2011, Ruxolitinib was the first of the JAK inhibitors to be approved in clinics for high-risk MF and later on for hydroxyurea-refractory PV and steroid-refractory acute graft-versus-host disease. MPN model studies showed that ruxolitinib treatment improved clinical manifestations in mice without eradication of MPN-initiating cells assayed in secondary transplantations.

The type II JAK2 inhibitor CHZ868, reversing the type I JAK inhibitor persistence acquired by MPN cells through reactivation of the JAK/STAT signaling (Koppikar et al., 2012), was more efficient than type I inhibitor in decreasing BM allele burden of *Vav*-Cre/*Jak2*^{V617F} KI mice (Mullally et al., 2010) but was not tested in term of MPN-initiating cells in secondary transplantations. In addition, CHZ868 was also efficient in improving the phenotype and survival of *MPL*^{W515L} RV transduced BALB/c and C57BL/6 mice, slightly reducing allele burden in blood (from 73% to 63% GFP + cells) (Meyer et al., 2015).

Overall, JAK2 inhibitors in MPN animal models rapidly reduced splenomegaly, RBC/neutrophil parameters and circulating levels of inflammatory cytokines without providing a convincing molecular remission. In that sense, MPN model reproduces the effects observed with these molecules in patients and represent good preclinical models, type II JAK2 inhibitors

ARTICLE IN PRESS

remaining to be tested in humans. They are presently tested in association with other small molecule inhibiting either other signaling molecules or epigenetic regulators.

4.6.2 Interferon-alpha (IFNα)

IFNα is the treatment providing the most frequent molecular remissions in patients (8–20% of patients) (Gowin et al., 2017; Kiladjian et al., 2008; Quintás-Cardama et al., 2011). IFNα treatment of MPN mouse models reproduced quite faithfully the effects observed in patients treated with pegylated-IFNα. Indeed, in contrast to JAK2 inhibitors, IFNα tested in chimeric models with transplanted *Jak2*^{WT} and *Jak2*^{V617F} KI cells, by Mullally et al. (2013) and Hasan et al. (2013), led to complete eradication of the disease-initiating cells assayed in secondary BM transplantation. Yet, the mechanism of action of IFNα remains largely unknown, limiting the improvement of the treatment (Kiladjian et al., 2008). MPN animal models provided good tools to investigate them. Mullally et al. showed that *Jak2*^{V617F} BM cells invalidated for the IFNα receptor (*Ifnar1*$^{-/-}$) transplanted with normal BM cells did not respond to IFNα treatment. This experiment demonstrated that IFNα acts by a mechanism intrinsic to the *Jak2*^{V617F} clones rather than by an immunological rejection of tumor cells provided by T/B cells mostly not invalidated for *Ifnar1* in this chimeric model. This intrinsic mechanism could be a preferential depletion or apoptosis of mutated clones by IFNα. Mullaly and colleagues found that IFNα was more potent in inducing *Jak2*^{V617F} than *Jak2*^{WT} stem cell-cycle activation suggesting a loss of self-renewal of mutated HSC. Hasan et al. demonstrated that IFNα was more potent in inducing spleen *Jak2*^{V617F} than *Jak2*^{WT} cells apoptosis. Recently, Austin et al., using chronic peg-IFN-α administration, showed that IFNα induced a greater STAT1 pathway activation in *Jak2*^{V617F} than in *Jak2*^{WT} HSCs, with increased induction of ROS, DNA damage and a reduction in quiescence (Austin et al., 2020). Related to the role of ROS, this seems in contradiction with preclinical studies using the antioxidant *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) that improved *Vav*-Cre/*Jak2*^{V617F} mouse symptoms (reduction of splenomegaly and blood parameters) as well as decreased MPN-initiating cells (Marty et al., 2013) or the overall survival of mice by inhibiting thrombosis (Craver et al., 2020). Of note, Austin et al. demonstrated distinct effects of IFNα and Ruxolitinib on HSC that may be useful for ongoing clinical efforts to combine both. More recently, Dagher and colleagues treated *Jak2*^{V617F} KI mice with IFNα alone or a combination with arsenic trioxide (ATO). They found that IFNα+ATO was more

efficient than IFNα alone in reducing disease-initiating cells and relapses after treatment arrest. To better understand these observations, they crossed the *Jak2*^{V617F} mice with *PML* KO mice. Results show that in the absence of the tumor suppressor gene *PML*, IFNα is less effective, predicting potent clinical efficacy of the IFNα + ATO combination in patients and identifying PML as a major effector of therapy (Dagher et al., 2021).

Overall, these preclinical studies in MPN mouse models paved the way to improve curative treatments of MPNs by IFNα.

5. Conclusions and remarks

MPN mouse models have proven extraordinarily useful in understanding the etiology, initiation, transformation, mechanisms of fibrosis/hemostasis, roles of additional mutations and novel clinical approaches of human MPN. Expressions of *JAK2*^{V617F}, *CALR* and *MPL* mutations in mouse HSCs mimic quite faithfully human PV or ET with their natural evolutions into MF, demonstrating that these mutations are drivers in MPNs. These models also identified the role of additional mutations in disease evolution, in particular *TET2* and *DNMT3a* in accelerated clonal progression, *EZH2*, *DNMT3a*, *ASXL1* in MF development, *ASXL1*, *IDH1* or *TP53* loss in secondary acute leukemia transformation. They also largely contributed to the identification of mechanisms implicated in the onset of MF, pointing out the essential roles of dysplastic MKs with TGF-β1 and other factors, the cellular origins of the excess ECM producer myofibroblasts or the contribution of mutations including *DNMT3a* and *EZH2* with its PCR2 target *Hmga2*. Furthermore, animal models, similarly to patients, present high percentages of unexpected deaths due to thrombosis or hemorrhages and have proven to be precious tools to investigate mechanisms and key players involved in these complications, with the fact that they were not preventively treated. In most models, thrombosis with occlusive clots is not prevalent in contrast to hemorrhage with accelerated formations of unstable clots and embolization probably due to an acquired vWF syndrome. Identified players are pro-inflammatory/adhesive leukocytes leading to increased NET formation, microvesicles leading to endothelial oxidative stress and vascular arterial spasms. The therapeutic efforts to target the main protagonists of fibrosis and hemostasis disorders have not yet been successful but no doubt that preclinical animal models will be precious in discovering

ARTICLE IN PRESS

new drugs able to prevent these two main life-threatening MPN complications. In this regards, extensive data with JAK2 inhibitors and IFNα showed that these models reproduced quite faithfully the effects observed in patients with these drugs.

Still, controversial results remain such as the full implication of *JAK2*^{V617F} in disease initiation and clonal expansion. Indeed, these models cannot fully reproduce the human disease related to the development of the initial clone without severe replicative/oxidative stress caused by BM transplantation or a perfect heterozygous mutated/normal 1/1 gene ratio with appropriate signaling partners. As mentioned in this review, mice themself are not small people and they differ from humans, considering MPN, by the spleen function, the usage of different primary tumor repressor pathways, the steady state of active/quiescent HSCs and different components of cellular immunology/inflammation. Finally, the contribution of germline genetic predisposition, age, HSC niche, metabolic, oxidative, replicative or genotoxic stress, inflammation, immune escape and multiple mutations need to be considered and further investigated to encompass the full complexity of human MPN in mice.

Acknowledgments

This work was supported by grants from MPN research foundation on IFN initiative, INCA Plbio 2014, 2018, Labex GR-Ex. C.B. and T.D. were supported by PhD grants from Université Paris Sud Saclay and Ligue Nationale contre le Cancer, respectively. We thanks Marie Charlotte Bourrienne, from Bichat hospital, Paris, France, for her great contribution to the hemostasis chapter, Dr. Isabelle Plo and Dr. William Vainchenker from INSERM, UMR 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France, for critical review and contributions to the manuscript. Authors have declared that no conflict of interest exists.

References

Abdel-Wahab, O., Pardanani, A., Rampal, R., Lasho, T.L., Levine, R.L., Tefferi, A., 2011. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. Leukemia 25, 1219–1220. https://doi.org/10.1038/leu.2011.82.

Abdel-Wahab, O., Gao, J., Adli, M., Dey, A., Trimarchi, T., Chung, Y.R., Kuscu, C., Hricik, T., Ndiaye-Lobry, D., Lafave, L.M., Koche, R., Shih, A.H., Guryanova, O.A., Kim, E., Li, S., Pandey, S., Shin, J.Y., Telis, L., Liu, J., Bhatt, P.K., Monette, S., Zhao, X., Mason, C.E., Park, C.Y., Bernstein, B.E., Aifantis, I., Levine, R.L., 2013. Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. J. Exp. Med. 210, 2641–2659. https://doi.org/10.1084/jem.20131141.

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

ARTICLE IN PRESS

Akada, H., Akada, S., Hutchison, R.E., Mohi, G., 2014. Loss of wild-type Jak2 allele enhances myeloid cell expansion and accelerates myelofibrosis in Jak2V617F knock-in mice. Leukemia 28, 1627–1635. https://doi.org/10.1038/leu.2014.52.

Arranz, L., Sánchez-Aguilera, A., Martín-Pérez, D., Isern, J., Langa, X., Tzankov, A., Lundberg, P., Muntión, S., Tzeng, Y.-S., Lai, D.-M., Schwaller, J., Skoda, R.C., Méndez-Ferrer, S., 2014. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. Nature 512, 78–81. https://doi.org/10.1038/nature13383.

Austin, R.J., Straube, J., Bruedigam, C., Pali, G., Jacquelin, S., Vu, T., Green, J., Gräsel, J., Lansink, L., Cooper, L., Lee, S.-J., Chen, N.-T., Lee, C.-W., Haque, A., Heidel, F.H., D'Andrea, R., Hill, G.R., Mullally, A., Milsom, M.D., Bywater, M., Lane, S.W., 2020. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm hematopoietic stem cell populations. Leukemia 34, 1075–1089. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0638-y.

Balligand, T., Achouri, Y., Pecquet, C., Chachoua, I., Nivarthi, H., Marty, C., Vainchenker, W., Plo, I., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., 2016. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. Leukemia 30, 1775–1778. https://doi.org/10.1038/leu.2016.47.

Balligand, T., Achouri, Y., Pecquet, C., Gaudray, G., Colau, D., Hug, E., Rahmani, Y., Stroobant, V., Plo, I., Vainchenker, W., Kralovics, R., Van den Eynde, B.J., Defour, J.-P., Constantinescu, S.N., 2020. Knock-in of murine Calr del52 induces essential thrombocythemia with slow-rising dominance in mice and reveals key role of Calr exon 9 in cardiac development. Leukemia 34 (2), 510–521. https://doi.org/10.1038/s41375-019-0538-1.

Barbui, T., Falanga, A., 2016. Molecular biomarkers of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Thromb. Res. 140 (Suppl. 1), S71–S75. https://doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30102-5.

Barosi, G., Ambrosetti, A., Centra, A., Falcone, A., Finelli, C., Foa, P., Grossi, A., Guarnone, R., Rupoli, S., Luciano, L., Petti, M.C., Pogliani, E., Russo, D., Ruggeri, M., Quaglini, S., 1998. Splenectomy and risk of blast transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Italian cooperative study group on myeloid with myeloid metaplasia. Blood 91, 3630–3636.

Bartalucci, N., Bogani, C., Vannucchi, A.M., 2013. Preclinical models for drug selection in myeloproliferative neoplasms. Curr. Hematol. Malig. Rep. 8, 317–324. https://doi.org/10.1007/s11899-013-0182-1.

Bellanné-Chantelot, C., Rabadan Moraes, G., Schmaltz-Panneau, B., Marty, C., Vainchenker, W., Plo, I., 2020. Germline genetic factors in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood Rev. 42, 100710. https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100710.

Benlabiod, C., da Cacemiro, M.C., Nédélec, A., Edmond, V., Muller, D., Rameau, P., Touchard, L., Gonin, P., Constantinescu, S.N., Raslova, H., Villeval, J.-L., Vainchenker, W., Plo, I., Marty, C., 2020. Calreticulin del52 and ins5 knock-in mice recapitulate different myeloproliferative phenotypes observed in patients with MPN. Nat. Commun. 11, 4886. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18691-3.

Bumm, T.G.P., Elsea, C., Corbin, A.S., Loriaux, M., Sherbenou, D., Wood, L., Deininger, J., Silver, R.T., Druker, B.J., Deininger, M.W.N., 2006. Characterization of murine JAK2V617F-positive myeloproliferative disease. Cancer Res. 66, 11156–11165. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2210.

Busque, L., Patel, J.P., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Provost, S., Hamilou, Z., Mollica, L., Li, J., Viale, A., Heguy, A., Hassimi, M., Socci, N., Bhatt, P.K., Gonen, M., Mason, C.E., Melnick, A., Godley, L.A., Brennan, C.W.,

ARTICLE IN PRESS

Abdel-Wahab, O., Levine, R.L., 2012. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. Nat. Genet. 44, 1179–1181. https://doi.org/10.1038/ng.2413.

Cabagnols, X., Defour, J.P., Ugo, V., Ianotto, J.C., Mossuz, P., Mondet, J., Girodon, F., Alexandre, J.H., Mansier, O., Viallard, J.F., Lippert, E., Murati, A., Mozziconacci, M.J., Saussoy, P., Vekemans, M.C., Knoops, L., Pasquier, F., Ribrag, V., Solary, E., Plo, I., Constantinescu, S.N., Casadevall, N., Vainchenker, W., Marzac, C., Bluteau, O., 2015. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. Leukemia 29, 249–252. https://doi.org/10.1038/leu.2014.270.

Cannizzo, S.J., Frey, B.M., Raffi, S., Moore, M.A., Eaton, D., Suzuki, M., Singh, R., Mack, C.A., Crystal, R.G., 1997. Augmentation of blood platelet levels by intratracheal administration of an adenovirus vector encoding human thrombopoietin cDNA. Nat. Biotechnol. 15, 570–573. https://doi.org/10.1038/nbt0697-570.

Castiglione, M., Jiang, Y.-P., Mazzeo, C., Lee, S., Chen, J.-S., Kaushansky, K., Yin, W., Lin, R.Z., Zheng, H., Zhan, H., 2020. Endothelial JAK2V617F mutation leads to thrombosis, vasculopathy, and cardiomyopathy in a murine model of myeloproliferative neoplasm. J. Thromb. Haemost. 18 (12), 3359–3370. https://doi.org/10.1111/jth.15095.

Chagraoui, H., Komura, E., Tulliez, M., Giraudier, S., Vainchenker, W., Wendling, F., 2002. Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. Blood 100, 3495–3503. https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1133.

Chagraoui, H., Tulliez, M., Smayra, T., Komura, E., Giraudier, S., Yun, T., Lassau, N., Vainchenker, W., Wendling, F., 2003. Stimulation of osteoprotegerin production is responsible for osteosclerosis in mice overexpressing TPO. Blood 101, 2983–2989. https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2839.

Challen, G.A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J.S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., Liang, S., Lu, Y., Darlington, G.J., Meissner, A., Issa, J.-P.J., Godley, L.A., Li, W., Goodell, M.A., 2011. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat. Genet. 44, 23–31. https://doi.org/10.1038/ng.1009.

Chapeau, E.A., Mandon, E., Gill, J., Romanet, V., Ebel, N., Powajbo, V., Andraos-Rey, R., Qian, Z., Kininis, M., Zumstein-Mecker, S., Ito, M., Hynes, N.E., Tiedt, R., Hofmann, F., Eshkind, L., Bockamp, E., Kinzel, B., Mueller, M., Murakami, M., Baffert, F., Radimerski, T., 2019. A conditional inducible JAK2V617F transgenic mouse model reveals myeloproliferative disease that is reversible upon switching off transgene expression. PLoS One 14. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221635, e0221635.

Chen, E., Beer, P.A., Godfrey, A.L., Ortmann, C.A., Li, J., Costa-Pereira, A.P., Ingle, C.E., Dermitzakis, E.T., Campbell, P.J., Green, A.R., 2010. Distinct clinical phenotypes associated with JAK2V617F reflect differential STAT1 signaling. Cancer Cell 18, 524–535. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.013.

Chen, E., Schneider, R.K., Breyfogle, L.J., Rosen, E.A., Poveromo, L., Elf, S., Ko, A., Brumme, K., Levine, R., Ebert, B.L., Mullally, A., 2015. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. Blood 125, 327–335. https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-567024.

Craver, B.M., Ramanathan, G., Hoang, S., Chang, X., Mendez Luque, L.F., Brooks, S., Lai, H.Y., Fleischman, A.G., 2020. N-acetylcysteine inhibits thrombosis in a murine model of myeloproliferative neoplasm. Blood Adv. 4, 312–321. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000967.

Croker, B.A., Metcalf, D., Robb, L., Wei, W., Mifsud, S., DiRago, L., Cluse, L.A., Sutherland, K.D., Hartley, L., Williams, E., Zhang, J.-G., Hilton, D.J., Nicola, N.A., Alexander, W.S., Roberts, A.W., 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.

Dagher, T., Maslah, N., Edmond, V., Cassinat, B., Vainchenker, W., Giraudier, S., Pasquier, F., Verger, E., Niwa-Kawakita, M., Lallemand-Breitenbach, V., Plo, I., Kiladjian, J.-J., Villeval, J.-L., de Thé, H., 2021. JAK2V617F myeloproliferative neoplasm eradication by a novel interferon/arsenic therapy involves PML. J. Exp. Med. 218 (2), e20201268. https://doi.org/10.1084/jem.20201268.

Debeurme, F., Lacout, C., Moratal, C., Bagley, R.G., Vainchenker, W., Adrian, F., Villeval, J.-L., 2015. JAK2 inhibition has different therapeutic effects according to myeloproliferative neoplasm development in mice. J. Cell. Mol. Med. 19, 2564–2574. https://doi.org/10.1111/jcmm.12608.

Decker, M., Martinez-Morentin, L., Wang, G., Lee, Y., Liu, Q., Leslie, J., Ding, L., 2017. Leptin-receptor-expressing bone marrow stromal cells are myofibroblasts in primary myelofibrosis. Nat. Cell Biol. 19, 677–688. https://doi.org/10.1038/ncb3530.

Delhommeau, F., Dupont, S., Tonetti, C., Massé, A., Godin, I., Le Couedic, J.-P., Debili, N., Saulnier, P., Casadevall, N., Vainchenker, W., Giraudier, S., 2007. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. Blood 109, 71–77. https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-007146.

Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., Kosmider, O., Le Couedic, J.-P., Robert, F., Alberdi, A., Lécluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F.J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S.P., Dessen, P., Soulier, J., Viguié, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., Bernard, O.A., 2009. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N. Engl. J. Med. 360, 2289–2301. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810069.

Dong, L., Yu, W.-M., Zheng, H., Loh, M.L., Bunting, S.T., Pauly, M., Huang, G., Zhou, M., Broxmeyer, H.E., Scadden, D.T., Qu, C.-K., 2016. Leukaemogenic effects of Ptpn11 activating mutations in the stem cell microenvironment. Nature 539, 304–308. https://doi.org/10.1038/nature20131.

Dorsheimer, L., Assmus, B., Rasper, T., Ortmann, C.A., Ecke, A., Abou-El-Ardat, K., Schmid, T., Brüne, B., Wagner, S., Serve, H., Hoffmann, J., Seeger, F., Dimmeler, S., Zeiher, A.M., Rieger, M.A., 2019. Association of mutations contributing to clonal hematopoiesis with prognosis in chronic ischemic heart failure. JAMA Cardiol. 4, 25–33. https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.3965.

Duek, A., Lundberg, P., Shimizu, T., Grisouard, J., Karow, A., Kubovcakova, L., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Skoda, R.C., 2014. Loss of Stat1 decreases megakaryopoiesis and favors erythropoiesis in a JAK2-V617F-driven mouse model of MPNs. Blood 123, 3943–3950. https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-514208.

Elf, S., Abdelfattah, N.S., Chen, E., Perales-Patón, J., Rosen, E.A., Ko, A., Peisker, F., Florescu, N., Giannini, S., Wolach, O., Morgan, E.A., Tothova, Z., Losman, J.-A., Schneider, R.K., Al-Shahrour, F., Mullally, A., 2016. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. Cancer Discov. 6, 368–381. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1434.

El-Khoury, M., Cabagnols, X., Mosca, M., Vertenoeil, G., Marzac, C., Favale, F., Bluteau, O., Lorre, F., Tisserand, A., Rabadan Moraes, G., Ugo, V., Lanotto, J.-C., Rey, J., Solary, E., Roy, L., Rameau, P., Debili, N., Pasquier, F., Casadevall, N., Marty, C., Constantinescu, S.N., Raslova, H., Vainchenker, W., Plo, I., 2020. Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. Oncogene 39 (31), 5323–5337. https://doi.org/10.1038/s41388-020-1368-3.

ARTICLE IN PRESS

Erba, B.G., Gruppi, C., Corada, M., Pisati, F., Rosti, V., Bartalucci, N., Villeval, J.-L., Vannucchi, A.M., Barosi, G., Balduini, A., Dejana, E., 2017. Endothelial-to-mesenchymal transition in bone marrow and spleen of primary myelofibrosis. Am. J. Pathol. 187, 1879–1892. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.04.006.

Ernst, T., Chase, A.J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C.E., Bryant, C., Jones, A.V., Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F.M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H.G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boultwood, J., Grand, F.H., Cross, N.C.P., 2010. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat. Genet. 42, 722–726. https://doi.org/10.1038/ng.621.

Etheridge, S.L., Roh, M.E., Cosgrove, M.E., Sangkhae, V., Fox, N.E., Chen, J., López, J.A., Kaushansky, K., Hitchcock, I.S., 2014. JAK2V617F-positive endothelial cells contribute to clotting abnormalities in myeloproliferative neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 2295–2300. https://doi.org/10.1073/pnas.1312148111.

Faubert, B., Solmonson, A., DeBerardinis, R.J., 2020. Metabolic reprogramming and cancer progression. Science 368 (6487). https://doi.org/10.1126/science.aaw5473, eaaw5473.

Fisher, C.L., Pineault, N., Brookes, C., Helgason, C.D., Ohta, H., Bodner, C., Hess, J.L., Humphries, R.K., Brock, H.W., 2010. Loss-of-function additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. Blood 115, 38–46. https://doi.org/10.1182/blood-2009-07-230698.

Fleischman, A.G., Aichberger, K.J., Luty, S.B., Bumm, T.G., Petersen, C.L., Doratotaj, S., Vasudevan, K.B., LaTocha, D.H., Yang, F., Press, R.D., Loriaux, M.M., Pahl, H.L., Silver, R.T., Agarwal, A., O'Hare, T., Druker, B.J., Bagby, G.C., Deininger, M.W., 2011. TNFα facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. Blood 118, 6392–6398. https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-348144.

Frey, B.M., Rafii, S., Crystal, R.G., Moore, M.A., 1998. Adenovirus long-term expression of thrombopoietin in vivo: a new model for myeloproliferative syndrome and osteomyelofibrosis. Schweiz. Med. Wochenschr. 128, 1587–1592.

Fuster, J.J., MacLauchlan, S., Zuriaga, M.A., Polackal, M.N., Ostriker, A.C., Chakraborty, R., Wu, C.-L., Sano, S., Muralidharan, S., Rius, C., Vuong, J., Jacob, S., Muralidhar, V., Robertson, A.A.B., Cooper, M.A., Andrés, V., Hirschi, K.K., Martin, K.A., Walsh, K., 2017. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. Science 355, 842–847. https://doi.org/10.1126/science.aag1381.

Gastinne, T., Vigant, F., Lavenu-Bombled, C., Wagner-Ballon, O., Tulliez, M., Chagraoui, H., Villeval, J.-L., Lacout, C., Perricaudet, M., Vainchenker, W., Benihoud, K., Giraudier, S., 2007. Adenoviral-mediated TGF-beta1 inhibition in a mouse model of myelofibrosis inhibit bone marrow fibrosis development. Exp. Hematol. 35, 64–74. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2006.08.016.

Göthert, J.R., Gustin, S.E., Hall, M.A., Green, A.R., Göttgens, B., Izon, D.J., Begley, C.G., 2005. In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. Blood 105, 2724–2732. https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3037.

Gowin, K., Jain, T., Kosiorek, H., Tibes, R., Camoriano, J., Palmer, J., Mesa, R., 2017. Pegylated interferon alpha—2a is clinically effective and tolerable in myeloproliferative neoplasm patients treated off clinical trial. Leuk. Res. 54, 73–77. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2017.01.006.

Greten, F.R., Grivennikov, S.I., 2019. Inflammation and cancer: triggers, mechanisms, and consequences. Immunity 51, 27–41. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.06.025.

Grisouard, J., Shimizu, T., Duek, A., Kubovcakova, L., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Skoda, R.C., 2015. Deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhances thrombocytosis and shortens survival in a JAK2-V617F mouse model of MPN. Blood 125, 2131–2140. https://doi.org/10.1182/blood-2014-08-594572.

Grisouard, J., Li, S., Kubovcakova, L., Rao, T.N., Meyer, S.C., Lundberg, P., Hao-Shen, H., Romanet, V., Murakami, M., Radimerski, T., Dirnhofer, S., Skoda, R.C., 2016. JAK2 exon 12 mutant mice display isolated erythrocytosis and changes in iron metabolism favoring increased erythropoiesis. Blood 128, 839–851. https://doi.org/10.1182/blood-2015-12-689216.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., Karin, M., 2010. Immunity, inflammation, and cancer. Cell 140, 883–899. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025.

Guerrero, J.A., Bennett, C., van der Weyden, L., McKinney, H., Chin, M., Nurden, P., McIntyre, Z., Cambridge, E.L., Estabel, J., Wardle-Jones, H., Speak, A.O., Erber, W.N., Rendon, A., Ouwehand, W.H., Ghevaert, C., 2014. Gray platelet syndrome: proinflammatory megakaryocytes and α-granule loss cause myelofibrosis and confer metastasis resistance in mice. Blood 124, 3624–3635. https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-566760.

Guglielmelli, P., Zini, R., Bogani, C., Salati, S., Pancrazzi, A., Bianchi, E., Mannelli, F., Ferrari, S., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., Bosi, A., Barosi, G., Migliaccio, A.R., Manfredini, R., Vannucchi, A.M., 2007. Molecular profiling of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis identifies a set of disease-associated genes and reveals the clinical significance of Wilms' tumor gene 1 (WT1). Stem Cells 25, 165–173. https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0351.

Guo, Y., Zhou, Y., Yamatomo, S., Yang, H., Zhang, P., Chen, S., Nimer, S.D., Zhao, Z.J., Xu, M., Bai, J., Yang, F.-C., 2019. ASXL1 alteration cooperates with JAK2V617F to accelerate myelofibrosis. Leukemia 33, 1287–1291. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0347-y.

Guy, A., Gourdou-Latyszenok, V., Le Lay, N., Peghaire, C., Kilani, B., Dias, J.V., Duplaa, C., Renault, M.-A., Denis, C., Villeval, J.L., Boulaftali, Y., Jandrot-Perrus, M., Couffinhal, T., James, C., 2019. Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. Haematologica 104, 70–81. https://doi.org/10.3324/haematol.2018.195321.

Hasan, S., Lacout, C., Marty, C., Cuingnet, M., Solary, E., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., 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.

Hobbs, C.M., Manning, H., Bennett, C., Vasquez, L., Severin, S., Brain, L., Mazharian, A., Guerrero, J.A., Li, J., Soranzo, N., Green, A.R., Watson, S.P., Ghevaert, C., 2013. JAK2V617F leads to intrinsic changes in platelet formation and reactivity in a knock-in mouse model of essential thrombocythemia. Blood 122, 3787–3797. https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-501452.

Hong, S.-H., Dvorak-Ewell, M., Stevens, H.Y., Barish, G.D., Castro, G.L., Nofsinger, R., Frangos, J.A., Shoback, D., Evans, R.M., 2013. Rescue of a primary myelofibrosis model by retinoid-antagonist therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110, 18820–18825. https://doi.org/10.1073/pnas.1318974110.

Hsu, Y.-C., Chiu, Y.-C., Lin, C.-C., Kuo, Y.-Y., Hou, H.-A., Tzeng, Y.-S., Kao, C.-J., Chuang, P.-H., Tseng, M.-H., Hsiao, T.-H., Chou, W.-C., Tien, H.-F., 2017. The distinct biological implications of Asxl1 mutation and its roles in leukemogenesis revealed by a knock-in mouse model. J. Hematol. Oncol. 10, 139. https://doi.org/10.1186/s13045-017-0508-x.

Huang, Z., Richmond, T.D., Muntean, A.G., Barber, D.L., Weiss, M.J., Crispino, J.D., 2007. STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. J. Clin. Invest. 117, 3890–3899. https://doi.org/10.1172/JCI33010.

Inoue, D., Kitaura, J., Togami, K., Nishimura, K., Enomoto, Y., Uchida, T., Kagiyama, Y., Kawabata, K.C., Nakahara, F., Izawa, K., Oki, T., Maehara, A., Isobe, M., Tsuchiya, A.,

ARTICLE IN PRESS

Harada, Y., Harada, H., Ochiya, T., Aburatani, H., Kimura, H., Thol, F., Heuser, M., Levine, R.L., Abdel-Wahab, O., Kitamura, T., 2013. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation–altering ASXL1 mutations. J. Clin. Invest. 123, 4627–4640. https://doi.org/10.1172/JCI70739.

Inoue, D., Matsumoto, M., Nagase, R., Saika, M., Fujino, T., Nakayama, K.I., Kitamura, T., 2016. Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. Exp. Hematol. 44, 172–176.e1. https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.11.011.

Jacquelin, S., Straube, J., Cooper, L., Vu, T., Song, A., Bywater, M., Baxter, E., Heidecker, M., Wackrow, B., Porter, A., Ling, V., Green, J., Austin, R., Kazakoff, S., Waddell, N., Hesson, L.B., Pimanda, J.E., Stegelmann, F., Bullinger, L., Döhner, K., Rampal, R.K., Heckl, D., Hill, G.R., Lane, S.W., 2018. Jak2V617F and Dnmt3a loss cooperate to induce myelofibrosis through activated enhancer-driven inflammation. Blood 132, 2707–2721. https://doi.org/10.1182/blood-2018-04-846220.

Jacquelin, S., Kramer, F., Mullally, A., Lane, S.W., 2020. Murine models of myelofibrosis. Cancers 12 (9), 2381. https://doi.org/10.3390/cancers12092381.

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

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

Kakumitsu, H., Kamezaki, K., Shimoda, K., Karube, K., Haro, T., Numata, A., Shide, K., Matsuda, T., Oshima, K., Harada, M., 2005. Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. Leuk. Res. 29, 761–769. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2004.12.009.

Kameda, T., Shide, K., Yamaji, T., Kamiunten, A., Sekine, M., Taniguchi, Y., Hidaka, T., Kubuki, Y., Shimoda, H., Marutsuka, K., Sashida, G., Aoyama, K., Yoshimitsu, M., Harada, T., Abe, H., Miike, T., Iwakiri, H., Tahara, Y., Sueta, M., Yamamoto, S., Hasuike, S., Nagata, K., Iwama, A., Kitanaka, A., Shimoda, K., 2015. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. Blood 125, 304–315. https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-555508.

Kent, D.G., Li, J., Tanna, H., Fink, J., Kirschner, K., Pask, D.C., Silber, Y., Hamilton, T.L., Sneade, R., Simons, B.D., Green, A.R., 2013. Self-renewal of single mouse hematopoietic stem cells is reduced by JAK2V617F without compromising progenitor cell expansion. PLoS Biol. 11. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001576, e1001576.

Kiladjian, J.-J., 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. https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143537.

Kirsammer, G., Jilani, S., Liu, H., Davis, E., Gurbuxani, S., Le Beau, M.M., Crispino, J.D., 2008. Highly penetrant myeloproliferative disease in the Ts65Dn mouse model of down syndrome. Blood 111, 767–775. https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-085670.

ARTICLE IN PRESS

Klampfl, T., Gisslinger, H., Harutyunyan, A.S., Nivarthi, H., Rumi, E., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Gisslinger, B., Pietra, D., Chen, D., Vladimer, G.I., Bagienski, K., Milanesi, C., Casetti, I.C., Sant'Antonio, E., Ferretti, V., Elena, C., Schischlik, F., Cleary, C., Six, M., Schalling, M., Schönegger, A., Bock, C., Malcovati, L., Pascutto, C., Superti-Furga, G., Cazzola, M., Kralovics, R., 2013. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N. Engl. J. Med. 369, 2379–2390. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311347.

Koppikar, P., Bhagwat, N., Kilpivaara, O., Manshouri, T., Adli, M., Hricik, T., Liu, F., Saunders, L.M., Mullally, A., Abdel-Wahab, O., Leung, L., Weinstein, A., Marubayashi, S., Goel, A., Gönen, M., Estrov, Z., Ebert, B.L., Chiosis, G., Nimer, S.D., Bernstein, B.E., Verstovsek, S., Levine, R.L., 2012. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. Nature 489, 155–159. https://doi.org/10.1038/nature11303.

Kramann, R., Schneider, R.K., 2018. The identification of fibrosis-driving myofibroblast precursors reveals new therapeutic avenues in myelofibrosis. Blood 131, 2111–2119. https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-834820.

Kramann, R., DiRocco, D.P., Humphreys, B.D., 2013. Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. J. Pathol. 231, 273–289. https://doi.org/10.1002/path.4253.

Kramann, R., Schneider, R.K., DiRocco, D.P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P.A., Henderson, J.M., Ebert, B.L., Humphreys, B.D., 2015. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. Cell Stem Cell 16, 51–66. https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.11.004.

Kubovcakova, L., Lundberg, P., Grisouard, J., Hao-Shen, H., Romanet, V., Andraos, R., Murakami, M., Dirnhofer, S., Wagner, K.-U., Radimerski, T., Skoda, R.C., 2013. Differential effects of hydroxyurea and INC424 on mutant allele burden and myeloproliferative phenotype in a JAK2-V617F polycythemia vera mouse model. Blood 121, 1188–1199. https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-415646.

Lacout, C., Pisani, D.F., Tulliez, M., Gachelin, F.M., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., 2006. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. Blood 108, 1652–1660. https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002030.

Lamrani, L., Lacout, C., Ollivier, V., Denis, C.V., Gardiner, E., Ho Tin Noe, B., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., Jandrot-Perrus, M., 2014. Hemostatic disorders in a JAK2V617F-driven mouse model of myeloproliferative neoplasm. Blood 124, 1136–1145. https://doi.org/10.1182/blood-2013-10-530832.

Li, J., Spensberger, D., Ahn, J.S., Anand, S., Beer, P.A., Ghevaert, C., Chen, E., Forrai, A., Scott, L.M., Ferreira, R., Campbell, P.J., Watson, S.P., Liu, P., Erber, W.N., Huntly, B.J.P., Ottersbach, K., Green, A.R., 2010. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. Blood 116, 1528–1538. https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-259747.

Li, J., Kent, D.G., Godfrey, A.L., Manning, H., Nangalia, J., Aziz, A., Chen, E., Saeb-Parsy, K., Fink, J., Sneade, R., Hamilton, T.L., Pask, D.C., Silber, Y., Zhao, X., Ghevaert, C., Liu, P., Green, A.R., 2014. JAK2V617F homozygosity drives a phenotypic switch in myeloproliferative neoplasms, but is insufficient to sustain disease. Blood 123, 3139–3151. https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-510222.

Li, J., Prins, D., Park, H.J., Grinfeld, J., Gonzalez-Arias, C., Loughran, S., Dovey, O.M., Klampfl, T., Bennett, C., Hamilton, T.L., Pask, D.C., Sneade, R., Williams, M., Aungier, J., Ghevaert, C., Vassiliou, G.S., Kent, D.G., Green, A.R., 2018. Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage. Blood 131, 649–661. https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806356.

ARTICLE IN PRESS

Lu, X., Levine, R., Tong, W., Wernig, G., Pikman, Y., Zarnegar, S., Gilliland, D.G., Lodish, H., 2005. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 18962–18967. https://doi.org/10.1073/pnas.0509714102.

Lundberg, P., Takizawa, H., Kubovcakova, L., Guo, G., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Orkin, S.H., Manz, M.G., Skoda, R.C., 2014. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2-V617F. J. Exp. Med. 211, 2213–2230. https://doi.org/10.1084/jem.20131371.

Mansier, O., Kilani, B., Guitart, A.V., Guy, A., Gourdou-Latyszenok, V., Marty, C., Parrens, M., Plo, I., Vainchenker, W., James, C., 2019. Description of a knock-in mouse model of JAK2V617F MPN emerging from a minority of mutated hematopoietic stem cells. Blood 134, 2383–2387. https://doi.org/10.1182/blood.2019001163.

Martelli, F., Ghinassi, B., Panetta, B., Alfani, E., Gatta, V., Pancrazzi, A., Bogani, C., Vannucchi, A.M., Paoletti, F., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., 2005. Variegation of the phenotype induced by the Gata1low mutation in mice of different genetic backgrounds. Blood 106, 4102–4113. https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1060.

Marty, C., Lacout, C., Martin, A., Hasan, S., Jacquot, S., Birling, M.-C., Vainchenker, W., Villeval, J.-L., 2010. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. Blood 116, 783–787. https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-257063.

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

Marty, C., Pecquet, C., Nivarthi, H., El-Khoury, M., Chachoua, I., Tulliez, M., Villeval, J.L., Raslova, H., Kralovics, R., Constantinescu, S.N., Plo, I., Vainchenker, W., 2016. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. Blood 127, 1317–1324. https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679571.

Mascarenhas, J., Li, T., Sandy, L., Newsom, C., Petersen, B., Godbold, J., Hoffman, R., 2014. Anti-transforming growth factor-β therapy in patients with myelofibrosis. Leuk. Lymphoma 55, 450–452. https://doi.org/10.3109/10428194.2013.805329.

Matsuura, S., Thompson, C.R., Belghasem, M.E., Bekendam, R.H., Piasecki, A., Leiva, O., Ray, A., Italiano, J., Yang, M., Merill-Skoloff, G., Chitalia, V.C., Flaumenhaft, R., Ravid, K., 2020. Platelet dysfunction and thrombosis in JAK2V617F-mutated primary myelofibrotic mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 40, e262–e272. https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314760.

McKenney, A.S., Lau, A.N., Somasundara, A.V.H., Spitzer, B., Intlekofer, A.M., Ahn, J., Shank, K., Rapaport, F.T., Patel, M.A., Papalexi, E., Shih, A.H., Chiu, A., Freinkman, E., Akbay, E.A., Steadman, M., Nagaraja, R., Yen, K., Teruya-Feldstein, J., Wong, K.-K., Rampal, R., Vander Heiden, M.G., Thompson, C.B., Levine, R.L., 2018. JAK2/IDH-mutant-driven myeloproliferative neoplasm is sensitive to combined targeted inhibition. J. Clin. Invest. 128, 789–804. https://doi.org/10.1172/JCI94516.

Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K.H., Opas, M., MacLennan, D.H., Michalak, M., 1999. Calreticulin is essential for cardiac development. J. Cell Biol. 144, 857–868. https://doi.org/10.1083/jcb.144.5.857.

Mestas, J., Hughes, C.C.W., 2004. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. J. Immunol. 172, 2731–2738. https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731.

Metcalf, D., 1998. The molecular control of hematopoiesis: progress and problems with gene manipulation. Stem Cells 16, 314–321. https://doi.org/10.1002/stem.160314.

ARTICLE IN PRESS

Meyer, S.C., Keller, M.D., Chiu, S., Koppikar, P., Guryanova, O.A., Rapaport, F., Xu, K., Manova, K., Pankov, D., O'Reilly, R.J., Kleppe, M., McKenney, A.S., Shih, A.H., Shank, K., Ahn, J., Papalexi, E., Spitzer, B., Socci, N., Viale, A., Mandon, E., Ebel, N., Andraos, R., Rubert, J., Dammassa, E., Romanet, V., Dölemeyer, A., Zender, M., Heinlein, M., Rampal, R., Weinberg, R.S., Hoffman, R., Sellers, W.R., Hofmann, F., Murakami, M., Baffert, F., Gaul, C., Radimerski, T., Levine, R.L., 2015. CHZ868, a type II JAK2 inhibitor, reverses type I JAK inhibitor persistence and demonstrates efficacy in myeloproliferative neoplasms. Cancer Cell 28, 15–28. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.06.006.

Mo, J.-R., Mathur, A., Angagaw, M., Zhao, S., Wang, Y., Gargano, D., DiBacco, A., Bachman, E.S., 2009. Splenectomy normalizes hematocrit in murine polycythemia vera. PLoS One 4, e7286. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007286.

Moran-Crusio, K., Reavie, L., Shih, A., Abdel-Wahab, O., Ndiaye-Lobry, D., Lobry, C., Figueroa, M.E., Vasanthakumar, A., Patel, J., Zhao, X., Perna, F., Pandey, S., Madzo, J., Song, C., Dai, Q., He, C., Ibrahim, S., Beran, M., Zavadil, J., Nimer, S.D., Melnick, A., Godley, L.A., Aifantis, I., Levine, R.L., 2011. Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation. Cancer Cell 20, 11–24. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.001.

Morel, P., Duhamel, A., Hivert, B., Stalniekiewicz, L., Demory, J.-L., Dupriez, B., 2010. Identification during the follow-up of time-dependent prognostic factors for the competing risks of death and blast phase in primary myelofibrosis: a study of 172 patients. Blood 115, 4350–4355. https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-255943.

Mullally, A., Lane, S.W., Ball, B., Megerdichian, C., Okabe, R., Al-Shahrour, F., Paktinat, M., Haydu, J.E., Housman, E., Lord, A.M., Wernig, G., Kharas, M.G., Mercher, T., Kutok, J.L., Gilliland, D.G., Ebert, B.L., 2010. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. Cancer Cell 17, 584–596. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.05.015.

Mullally, A., Poveromo, L., Schneider, R.K., Al-Shahrour, F., Lane, S.W., Ebert, B.L., 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., Bruedigam, C., Poveromo, L., Heidel, F.H., Purdon, A., Vu, T., Austin, R., Heckl, D., Breyfogle, L.J., Kuhn, C.P., Kalaitzidis, D., Armstrong, S.A., Williams, D.A., Hill, G.R., Ebert, B.L., Lane, S.W., 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.

Nagase, R., Inoue, D., Pastore, A., Fujino, T., Hou, H.-A., Yamasaki, N., Goyama, S., Saika, M., Kanai, A., Sera, Y., Horikawa, S., Ota, Y., Asada, S., Hayashi, Y., Kawabata, K.C., Takeda, R., Tien, H.-F., Honda, H., Abdel-Wahab, O., Kitamura, T., 2018. Expression of mutant Asxl1 perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. J. Exp. Med. 215, 1729–1747. https://doi.org/10.1084/jem.20171151.

Nangalia, J., Massie, C.E., Baxter, E.J., Nice, F.L., Gundem, G., Wedge, D.C., Avezov, E., Li, J., Kollmann, K., Kent, D.G., Aziz, A., Godfrey, A.L., Hinton, J., Martincorena, I., Van Loo, P., Jones, A.V., Guglielmelli, P., Tarpey, P., Harding, H.P., Fitzpatrick, J.D., Goudie, C.T., Ortmann, C.A., Loughran, S.J., Raine, K., Jones, D.R., Butler, A.P., Teague, J.W., O'Meara, S., McLaren, S., Bianchi, M., Silber, Y., Dimitropoulou, D., Bloxham, D., Mudie, L., Maddison, M., Robinson, B., Keohane, C., Maclean, C., Hill, K., Orchard, K., Tauro, S., Du, M.-Q., Greaves, M., Bowen, D., Huntly, B.J.P., Harrison, C.N., Cross, N.C.P., Ron, D., Vannucchi, A.M.,

ARTICLE IN PRESS

Papaemmanuil, E., Campbell, P.J., Green, A.R., 2013. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. N. Engl. J. Med. 369, 2391–2405. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312542.

Nangalia, J., Nice, F.L., Wedge, D.C., Godfrey, A.L., Grinfeld, J., Thakker, C., Massie, C. E., Baxter, J., Sewell, D., Silber, Y., Campbell, P.J., Green, A.R., 2015. DNMT3A mutations occur early or late in patients with myeloproliferative neoplasms and mutation order influences phenotype. Haematologica 100, e438–e442. https://doi.org/10.3324/haematol.2015.129510.

Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P., Eaves, C.J., 2012. Cancer stem cells: an evolving concept. Nat. Rev. Cancer 12, 133–143. https://doi.org/10.1038/nrc3184.

Nguyen, T.K., Morse, S.J., Fleischman, A.G., 2016. Transduction-transplantation mouse model of myeloproliferative neoplasm. J. Vis. Exp. 118, 54624. https://doi.org/10.3791/54624.

O'Connell, K.E., Mikkola, A.M., Stepanek, A.M., Vernet, A., Hall, C.D., Sun, C.C., Yildirim, E., Staropoli, J.F., Lee, J.T., Brown, D.E., 2015. Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research. Comp. Med. 65, 96–113.

Ohwada, A., Rafii, S., Moore, M.A., Crystal, R.G., 1996. In vivo adenovirus vector-mediated transfer of the human thrombopoietin cDNA maintains platelet levels during radiation-and chemotherapy-induced bone marrow suppression. Blood 88, 778–784.

Ortmann, C.A., Kent, D.G., Nangalia, J., Silber, Y., Wedge, D.C., Grinfeld, J., Baxter, E.J., Massie, C.E., Papaemmanuil, E., Menon, S., Godfrey, A.L., Dimitropoulou, D., Guglielmelli, P., Bellosillo, B., Besses, C., Döhner, K., Harrison, C.N., Vassiliou, G.S., Vannucchi, A., Campbell, P.J., Green, A.R., 2015. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. N. Engl. J. Med. 372, 601–612. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412098.

Papathanasiou, P., Petvises, S., Hey, Y.-Y., Perkins, A.C., O'Neill, H.C., 2017. Impact of the c-MybE308G mutation on mouse myelopoiesis and dendritic cell development. PLoS One 12, e0176345. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176345.

Perrier, A., Roy, P.-M., Sanchez, O., Le Gal, G., Meyer, G., Gourdier, A.-L., Furber, A., Revel, M.-P., Howarth, N., Davido, A., Bounameaux, H., 2005. Multidetector-row computed tomography in suspected pulmonary embolism. N. Engl. J. Med. 352, 1760–1768. https://doi.org/10.1056/NEJMoa042905.

Pietra, D., Rumi, E., Ferretti, V.V., Di Buduo, C.A., Milanesi, C., Cavalloni, C., Sant'Antonio, E., Abbonante, V., Moccia, F., Casetti, I.C., Bellini, M., Renna, M.C., Roncoroni, E., Fugazza, E., Astori, C., Boveri, E., Rosti, V., Barosi, G., Balduini, A., Cazzola, M., 2016. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Leukemia 30, 431–438. https://doi.org/10.1038/leu.2015.277.

Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., DeAngelo, D.J., Clark, J.J., Lee, S.J., Golub, T.R., Wadleigh, M., Gilliland, D.G., Levine, R.L., 2006. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 3, e270. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030270.

Poisson, J., Hilscher, M.B., Tanguy, M., Hammoutene, A., Boulanger, C.M., Villeval, J.-L., Simonetto, D.A., Valla, D., Shah, V.H., Rautou, P.-E., 2018. Endothelial JAK2V617F does not enhance liver lesions in mice with Budd-Chiari syndrome. J. Hepatol. 68, 1086–1087. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.01.010.

Poisson, J., Tanguy, M., Davy, H., Camara, F., El Mdawar, M.-B., Kheloufi, M., Dagher, T., Devue, C., Lasselin, J., Plessier, A., Merchant, S., Blanc-Brude, O., Souyri, M., Mougenot, N., Dingli, F., Loew, D., Hatem, S.N., James, C.,

Villeval, J.-L., Boulanger, C.M., Rautou, P.-E., 2020. Erythrocyte-derived microvesicles induce arterial spasms in JAK2V617F myeloproliferative neoplasm. J. Clin. Invest. 130, 2630–2643. https://doi.org/10.1172/JCI124566.

Quintás-Cardama, A., Vaddi, K., Liu, P., Manshouri, T., Li, J., Scherle, P.A., Caulder, E., Wen, X., Li, Y., Waeltz, P., Rupar, M., Burn, T., Lo, Y., Kelley, J., Covington, M., Shepard, S., Rodgers, J.D., Haley, P., Kantarjian, H., Fridman, J.S., Verstovsek, S., 2010. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. Blood 115, 3109–3117. https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-214957.

Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H., Cortes, J., Verstovsek, S., 2011. Janus kinase inhibitors for the treatment of myeloproliferative neoplasias and beyond. Nat. Rev. Drug Discov. 10, 127–140. https://doi.org/10.1038/nrd3264.

Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., Godley, L., Opolon, P., Tilly, H., Solary, E., Duffourd, Y., Dessen, P., Merle-Beral, H., Nguyen-Khac, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., Bastard, C., Mercher, T., Bernard, O.A., 2011. TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. Cancer Cell 20, 25–38. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.003.

Rai, S., Hansen, N., Hao-Shen, H., Dirnhofer, S., Rao Tata, N., Skoda, R., 2019. IL-1β Secreted from mutant cells carrying JAK2-V617F favors early clonal expansion and promotes MPN disease initiation and progression. Blood 134 (Supplement 1), 307.

Rampal, R., Ahn, J., Abdel-Wahab, O., Nahas, M., Wang, K., Lipson, D., Otto, G.A., Yelensky, R., Hricik, T., McKenney, A.S., Chiosis, G., Chung, Y.R., Pandey, S., van den Brink, M.R.M., Armstrong, S.A., Dogan, A., Intlekofer, A., Manshouri, T., Park, C.Y., Verstovsek, S., Rapaport, F., Stephens, P.J., Miller, V.A., Levine, R.L., 2014. Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, E5401–E5410. https://doi.org/10.1073/pnas.1407792111.

Rangarajan, A., Weinberg, R.A., 2003. Opinion: comparative biology of mouse versus human cells: modelling human cancer in mice. Nat. Rev. Cancer 3, 952–959. https://doi.org/10.1038/nrc1235.

Rao, T.N., Hansen, N., Hilfiker, J., Rai, S., Majewska, J.-M., Leković, D., Gezer, D., Andina, N., Galli, S., Cassel, T., Geier, F., Delezie, J., Nienhold, R., Hao-Shen, H., Beisel, C., Di Palma, S., Dimeloe, S., Trebicka, J., Wolf, D., Gassmann, M., Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Handschin, C., Dirnhofer, S., Kröger, N., Hess, C., Radimerski, T., Koschmieder, S., Čokić, V.P., Skoda, R.C., 2019. JAK2-mutant hematopoietic cells display metabolic alterations that can be targeted to treat myeloproliferative neoplasms. Blood 134, 1832–1846. https://doi.org/10.1182/blood.2019000162.

Regis, G., Pensa, S., Boselli, D., Novelli, F., Poli, V., 2008. Ups and downs: the STAT1:STAT3 seesaw of interferon and gp130 receptor signalling. Semin. Cell Dev. Biol. 19, 351–359. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.06.004.

Rongvaux, A., Takizawa, H., Strowig, T., Willinger, T., Eynon, E.E., Flavell, R.A., Manz, M.G., 2013. Human hemato-lymphoid system mice: current use and future potential for medicine. Annu. Rev. Immunol. 31, 635–674. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095921.

Rosti, V., Villani, L., Riboni, R., Poletto, V., Bonetti, E., Tozzi, L., Bergamaschi, G., Catarsi, P., Dallera, E., Novara, F., Massa, M., Campanelli, R., Fois, G., Peruzzi, B., Lucioni, M., Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Fiandrino, G., Zuffardi, O., Magrini, U., Paulli, M., Vannucchi, A.M., Barosi, G., Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative (AGIMM) investigators, 2013. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. Blood 121, 360–368. https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404889.

ARTICLE IN PRESS

Rumi, E., Pietra, D., Ferretti, V., Klampfl, T., Harutyunyan, A.S., Milosevic, J.D., Them, N.C.C., Berg, T., Elena, C., Casetti, I.C., Milanesi, C., Sant'antonio, E., Bellini, M., Fugazza, E., Renna, M.C., Boveri, E., Astori, C., Pascutto, C., Kralovics, R., Cazzola, M., Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro Gruppo Italiano Malattie Mieloproliferative Investigators, 2014. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. Blood 123, 1544–1551. https://doi.org/10.1182/blood-2013-11-539098.

Rupec, R.A., Jundt, F., Rebholz, B., Eckelt, B., Weindl, G., Herzinger, T., Flaig, M.J., Moosmann, S., Plewig, G., Dörken, B., Förster, I., Huss, R., Pfeffer, K., 2005. Stroma-mediated dysregulation of myelopoiesis in mice lacking I kappa B alpha. Immunity 22, 479–491. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.009.

Saliba, J., Saint-Martin, C., Di Stefano, A., Lenglet, G., Marty, C., Keren, B., Pasquier, F., Valle, V.D., Secardin, L., Leroy, G., Mahfoudhi, E., Grosjean, S., Droin, N., Diop, M., Dessen, P., Charrier, S., Palazzo, A., Merlevede, J., Meniane, J.-C., Delaunay-Darivon, C., Fuseau, P., Isnard, F., Casadevall, N., Solary, E., Debili, N., Bernard, O.A., Raslova, H., Najman, A., Vainchenker, W., Bellanné-Chantelot, C., Plo, I., 2015. Germline duplication of ATG2B and GSKIP predisposes to familial myeloid malignancies. Nat. Genet. 47, 1131–1140. https://doi.org/10.1038/ng.3380.

Sangkhae, V., Etheridge, S.L., Kaushansky, K., Hitchcock, I.S., 2014. The thrombopoietin receptor, MPL, is critical for development of a JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. Blood 124, 3956–3963. https://doi.org/10.1182/blood-2014-07-587238.

Sano, S., Oshima, K., Wang, Y., Katanasaka, Y., Sano, M., Walsh, K., 2018. CRISPR-mediated gene editing to assess the roles of Tet2 and Dnmt3a in clonal hematopoiesis and cardiovascular disease. Circ. Res. 123, 335–341. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313225.

Santos, F.P.S., Tam, C.S., Kantarjian, H., Cortes, J., Thomas, D., Pollock, R., Verstovsek, S., 2014. Splenectomy in patients with myeloproliferative neoplasms: efficacy, complications and impact on survival and transformation. Leuk. Lymphoma 55, 121–127. https://doi.org/10.3109/10428194.2013.794269.

Sasaki, M., Knobbe, C.B., Munger, J.C., Lind, E.F., Brenner, D., Brüstle, A., Harris, I.S., Holmes, R., Wakeham, A., Haight, J., You-Ten, A., Li, W.Y., Schalm, S., Su, S.M., Virtanen, C., Reifenberger, G., Ohashi, P.S., Barber, D.L., Figueroa, M.E., Melnick, A., Zúñiga-Pflücker, J.-C., Mak, T.W., 2012. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. Nature 488, 656–659. https://doi.org/10.1038/nature11323.

Sashida, G., Wang, C., Tomioka, T., Oshima, M., Aoyama, K., Kanai, A., Mochizuki-Kashio, M., Harada, H., Shimoda, K., Iwama, A., 2016. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. J. Exp. Med. 213, 1459–1477. https://doi.org/10.1084/jem.20151121.

Schneider, R.K., Mullally, A., Dugourd, A., Peisker, F., Hoogenboezem, R., Van Strien, P.M.H., Bindels, E.M., Heckl, D., Büsche, G., Fleck, D., Müller-Newen, G., Wongboonsin, J., Ventura Ferreira, M., Puelles, V.G., Saez-Rodriguez, J., Ebert, B.L., Humphreys, B.D., Kramann, R., 2017. Gli1+ mesenchymal stromal cells are a key driver of bone marrow fibrosis and an important cellular therapeutic target. Cell Stem Cell 20, 785–800.e8. https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.03.008.

Scott, L.M., Tong, W., Levine, R.L., Scott, M.A., Beer, P.A., Stratton, M.R., Futreal, P.A., Erber, W.N., McMullin, M.F., Harrison, C.N., Warren, A.J., Gilliland, D.G., Lodish, H.F., Green, A.R., 2007. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N. Engl. J. Med. 356, 459–468. https://doi.org/10.1056/NEJMoa065202.

ARTICLE IN PRESS

Shide, K., Shimoda, H.K., Kumano, T., Karube, K., Kameda, T., Takenaka, K., Oku, S., Abe, H., Katayose, K.S., Kubuki, Y., Kusumoto, K., Hasuike, S., Tahara, Y., Nagata, K., Matsuda, T., Ohshima, K., Harada, M., Shimoda, K., 2008. Development of ET, primary myelofibrosis and PV in mice expressing JAK2 V617F. Leukemia 22, 87–95. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2405043.

Shide, K., Kameda, T., Shimoda, H., Yamaji, T., Abe, H., Kamiunten, A., Sekine, M., Hidaka, T., Katayose, K., Kubuki, Y., Yamamoto, S., Miike, T., Iwakiri, H., Hasuike, S., Nagata, K., Marutsuka, K., Iwama, A., Matsuda, T., Kitanaka, A., Shimoda, K., 2012. TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis. Leukemia 26, 2216–2223. https://doi.org/10.1038/leu.2012.94.

Shide, K., Kameda, T., Yamaji, T., Sekine, M., Inada, N., Kamiunten, A., Akizuki, K., Nakamura, K., Hidaka, T., Kubuki, Y., Shimoda, H., Kitanaka, A., Honda, A., Sawaguchi, A., Abe, H., Miike, T., Iwakiri, H., Tahara, Y., Sueta, M., Hasuike, S., Yamamoto, S., Nagata, K., Shimoda, K., 2017. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. Leukemia 31, 1136–1144. https://doi.org/10.1038/leu.2016.308.

Shide, K., Kameda, T., Kamiunten, A., Oji, A., Ozono, Y., Sekine, M., Honda, A., Kitanaka, A., Akizuki, K., Tahira, Y., Nakamura, K., Hidaka, T., Kubuki, Y., Abe, H., Miike, T., Iwakiri, H., Tahara, Y., Sueta, M., Hasuike, S., Yamamoto, S., Nagata, K., Ikawa, M., Shimoda, K., 2019. Mice with Calr mutations homologous to human CALR mutations only exhibit mild thrombocytosis. Blood Cancer J. 9, 42. https://doi.org/10.1038/s41408-019-0202-z.

Shih, A.H., Abdel-Wahab, O., Patel, J.P., Levine, R.L., 2012. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. Nat. Rev. Cancer 12, 599–612. https://doi.org/10.1038/nrc3343.

Shimizu, T., Kubovcakova, L., Nienhold, R., Zmajkovic, J., Meyer, S.C., Hao-Shen, H., Geier, F., Dirnhofer, S., Guglielmelli, P., Vannucchi, A.M., Feenstra, J.D.M., Kralovics, R., Orkin, S.H., Skoda, R.C., 2016. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. J. Exp. Med. 213, 1479–1496. https://doi.org/10.1084/jem.20151136.

Skoda, R.C., 2010. JAK2 impairs stem cell function? Blood 116, 1392–1393. https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-287318.

Sykes, S.M., Scadden, D.T., 2013. Modeling human hematopoietic stem cell biology in the mouse. Semin. Hematol. 50, 92–100. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.03.029.

Tefferi, A., 2016. Somatic JAK2 mutations and their tumor phenotypes. Blood 128, 748–749. https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-722645.

Tefferi, A., Wassie, E.A., Guglielmelli, P., Gangat, N., Belachew, A.A., Lasho, T.L., Finke, C., Ketterling, R.P., Hanson, C.A., Pardanani, A., Wolanskyj, A.P., Maffioli, M., Casalone, R., Pacilli, A., Vannucchi, A.M., Passamonti, F., 2014. Type 1 versus type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. Am. J. Hematol. 89, E121–E124. https://doi.org/10.1002/ajh.23743.

Teofili, L., Martini, M., Cenci, T., Petrucci, G., Torti, L., Storti, S., Guidi, F., Leone, G., Larocca, L.M., 2007. 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. https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-069237.

Tiedt, R., Hao-Shen, H., Sobas, M.A., Looser, R., Dirnhofer, S., Schwaller, J., Skoda, R.C., 2008. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood 111, 3931–3940. https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107748.

ARTICLE IN PRESS

Toki, T., Katsuoka, F., Kanezaki, R., Xu, G., Kurotaki, H., Sun, J., Kamio, T., Watanabe, S., Tandai, S., Terui, K., Yagihashi, S., Komatsu, N., Igarashi, K., Yamamoto, M., Ito, E., 2005. Transgenic expression of BACH1 transcription factor results in megakaryocytic impairment. Blood 105, 3100–3108. https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2826.

Toppaldoddi, K.R., da Costa Cacemiro, M., Bluteau, O., Panneau-Schmaltz, B., Pioch, A., Muller, D., Villeval, J.-L., Raslova, H., Constantinescu, S.N., Plo, I., Vainchenker, W., Marty, C., 2019. Rare type 1-like and type 2-like calreticulin mutants induce similar myeloproliferative neoplasms as prevalent type 1 and 2 mutants in mice. Oncogene 38, 1651–1660. https://doi.org/10.1038/s41388-018-0538-z.

Tsuruta-Kishino, T., Koya, J., Kataoka, K., Narukawa, K., Sumitomo, Y., Kobayashi, H., Sato, T., Kurokawa, M., 2017. Loss of p53 induces leukemic transformation in a murine model of Jak2 V617F-driven polycythemia vera. Oncogene 36, 3300–3311. https://doi.org/10.1038/onc.2016.478.

Tyner, J.W., Bumm, T.G., Deininger, J., Wood, L., Aichberger, K.J., Loriaux, M.M., Druker, B.J., Burns, C.J., Fantino, E., Deininger, M.W., 2010. CYT387, a novel JAK2 inhibitor, induces hematologic responses and normalizes inflammatory cytokines in murine myeloproliferative neoplasms. Blood 115, 5232–5240. https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-223727.

Ueda, K., Ikeda, K., Ikezoe, T., Harada-Shirado, K., Ogawa, K., Hashimoto, Y., Sano, T., Ohkawara, H., Kimura, S., Shichishima-Nakamura, A., Nakamura, Y., Shikama, Y., Mori, T., Mason, P.J., Bessler, M., Morishita, S., Komatsu, N., Shide, K., Shimoda, K., Koide, S., Aoyama, K., Oshima, M., Iwama, A., Takeishi, Y., 2017. Hmga2 collaborates with JAK2V617F in the development of myeloproliferative neoplasms. Blood Adv. 1, 1001–1015. https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017004457.

Ulich, T.R., del Castillo, J., Senaldi, G., Kinstler, O., Yin, S., Kaufman, S., Tarpley, J., Choi, E., Kirley, T., Hunt, P., Sheridan, W.P., 1996. Systemic hematologic effects of PEG-rHuMGDF-induced megakaryocyte hyperplasia in mice. Blood 87, 5006–5015.

Uni, M., Masamoto, Y., Sato, T., Kamikubo, Y., Arai, S., Hara, E., Kurokawa, M., 2019. Modeling ASXL1 mutation revealed impaired hematopoiesis caused by derepression of p16Ink4a through aberrant PRC1-mediated histone modification. Leukemia 33, 191–204. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0198-6.

Vannucchi, A.M., Bianchi, L., Cellai, C., Paoletti, F., Rana, R.A., Lorenzini, R., Migliaccio, G., Migliaccio, A.R., 2002. Development of myelofibrosis in mice genetically impaired for GATA-1 expression (GATA-1(low) mice). Blood 100, 1123–1132. https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1913.

Vannucchi, A.M., Lasho, T.L., Guglielmelli, P., Biamonte, F., Pardanani, A., Pereira, A., Finke, C., Score, J., Gangat, N., Mannarelli, C., Ketterling, R.P., Rotunno, G., Knudson, R.A., Susini, M.C., Laborde, R.R., Spolverini, A., Pancrazzi, A., Pieri, L., Manfredini, R., Tagliafico, E., Zini, R., Jones, A., Zoi, K., Reiter, A., Duncombe, A., Pietra, D., Rumi, E., Cervantes, F., Barosi, G., Cazzola, M., Cross, N.C.P., Tefferi, A., 2013. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia 27, 1861–1869. https://doi.org/10.1038/leu.2013.119.

Verstovsek, S., Manshouri, T., Pilling, D., Bueso-Ramos, C.E., Newberry, K.J., Prijic, S., Knez, L., Bozinovic, K., Harris, D.M., Spaeth, E.L., Post, S.M., Multani, A.S., Rampal, R.K., Ahn, J., Levine, R.L., Creighton, C.J., Kantarjian, H.M., Estrov, Z., 2016. Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis. J. Exp. Med. 213, 1723–1740. https://doi.org/10.1084/jem.20160283.

Villeval, J.L., Metcalf, D., Johnson, G.R., 1992. Fatal polycythemia induced in mice by dysregulated erythropoietin production by hematopoietic cells. Leukemia 6, 107–115.

ARTICLE IN PRESS

Villeval, J.L., Cohen-Solal, K., Tulliez, M., Giraudier, S., Guichard, J., Burstein, S.A., Cramer, E.M., Vainchenker, W., Wendling, F., 1997. High thrombopoietin production by hematopoietic cells induces a fatal myeloproliferative syndrome in mice. Blood 90, 4369–4383.

Walkley, C.R., Olsen, G.H., Dworkin, S., Fabb, S.A., Swann, J., McArthur, G.A., Westmoreland, S.V., Chambon, P., Scadden, D.T., Purton, L.E., 2007. A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. Cell 129, 1097–1110. https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.014.

Walz, C., Ahmed, W., Lazarides, K., Betancur, M., Patel, N., Hennighausen, L., Zaleskas, V.M., Van Etten, R.A., 2012. Essential role for Stat5a/b in myeloproliferative neoplasms induced by BCR-ABL1 and JAK2(V617F) in mice. Blood 119, 3550–3560. https://doi.org/10.1182/blood-2011-12-397554.

Wang, J., Li, Z., He, Y., Pan, F., Chen, S., Rhodes, S., Nguyen, L., Yuan, J., Jiang, L., Yang, X., Weeks, O., Liu, Z., Zhou, J., Ni, H., Cai, C.-L., Xu, M., Yang, F.-C., 2014. Loss of Asxl1 leads to myelodysplastic syndrome-like disease in mice. Blood 123, 541–553. https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-500272.

Wendling, F., Maraskovsky, E., Debili, N., Florindo, C., Teepe, M., Titeux, M., Methia, N., Breton-Gorius, J., Cosman, D., Vainchenker, W., 1994. cMpl ligand is a humoral regulator of megakaryocytopoiesis. Nature 369, 571–574. https://doi.org/10.1038/369571a0.

Wernig, G., Mercher, T., Okabe, R., Levine, R.L., Lee, B.H., Gilliland, D.G., 2006. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. Blood 107, 4274–4281. https://doi.org/10.1182/blood-2005-12-4824.

Wernig, G., Kharas, M.G., Okabe, R., Moore, S.A., Leeman, D.S., Cullen, D.E., Gozo, M., McDowell, E.P., Levine, R.L., Doukas, J., Mak, C.C., Noronha, G., Martin, M., Ko, Y.D., Lee, B.H., Soll, R.M., Tefferi, A., Hood, J.D., Gilliland, D.G., 2008. Efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in treatment of a murine model of JAK2V617F-induced polycythemia vera. Cancer Cell 13, 311–320. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.02.009.

Wolach, O., Sellar, R.S., Martinod, K., Cherpokova, D., McConkey, M., Chappell, R.J., Silver, A.J., Adams, D., Castellano, C.A., Schneider, R.K., Padera, R.F., DeAngelo, D.J., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Galinsky, I., Stone, R.M., Genovese, G., McCarroll, S.A., Iliadou, B., Hultman, C., Neuberg, D., Mullally, A., Wagner, D.D., Ebert, B.L., 2018. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. Sci. Transl. Med. 10 (436), eaan8292. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan8292.

Xie, M., Lu, C., Wang, J., McLellan, M.D., Johnson, K.J., Wendl, M.C., McMichael, J.F., Schmidt, H.K., Yellapantula, V., Miller, C.A., Ozenberger, B.A., Welch, J.S., Link, D.C., Walter, M.J., Mardis, E.R., Dipersio, J.F., Chen, F., Wilson, R.K., Ley, T.J., Ding, L., 2014. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat. Med. 20, 1472–1478. https://doi.org/10.1038/nm.3733.

Xing, S., Wanting, T.H., Zhao, W., Ma, J., Wang, S., Xu, X., Li, Q., Fu, X., Xu, M., Zhao, Z.J., 2008. Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice. Blood 111, 5109–5117. https://doi.org/10.1182/blood-2007-05-091579.

Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., Taketo, M.M., Karlsson, S., Iwama, A., Nakauchi, H., 2011. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Cell 147, 1146–1158. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.053.

ARTICLE IN PRESS

Yan, X.Q., Lacey, D., Fletcher, F., Hartley, C., McElroy, P., Sun, Y., Xia, M., Mu, S., Saris, C., Hill, D., Hawley, R.G., McNiece, I.K., 1995. Chronic exposure to retroviral vector encoded MGDF (mpl-ligand) induces lineage-specific growth and differentiation of megakaryocytes in mice. Blood 86, 4025–4033.

Yan, X.Q., Lacey, D., Hill, D., Chen, Y., Fletcher, F., Hawley, R.G., McNiece, I.K., 1996. A model of myelofibrosis and osteosclerosis in mice induced by overexpressing thrombopoietin (mpl ligand): reversal of disease by bone marrow transplantation. Blood 88, 402–409.

Yan, D., Hutchison, R.E., Mohi, G., 2012. Critical requirement for Stat5 in a mouse model of polycythemia vera. Blood 119, 3539–3549. https://doi.org/10.1182/blood-2011-03-345215.

Yan, D., Jobe, F., Hutchison, R.E., Mohi, G., 2015. Deletion of Stat3 enhances myeloid cell expansion and increases the severity of myeloproliferative neoplasms in Jak2V617F knock-in mice. Leukemia 29, 2050–2061. https://doi.org/10.1038/leu.2015.116.

Yang, Y., Akada, H., Nath, D., Hutchison, R.E., Mohi, G., 2016. Loss of Ezh2 cooperates with Jak2V617F in the development of myelofibrosis in a mouse model of myeloproliferative neoplasm. Blood 127, 3410–3423. https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679431.

Yang, H., Kurtenbach, S., Guo, Y., Lohse, I., Durante, M.A., Li, J., Li, Z., Al-Ali, H., Li, L., Chen, Z., Field, M.G., Zhang, P., Chen, S., Yamamoto, S., Li, Z., Zhou, Y., Nimer, S.D., Harbour, J.W., Wahlestedt, C., Xu, M., Yang, F.-C., 2018. Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. Blood 131, 328–341. https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-789669.

Yue, L., Bartenstein, M., Zhao, W., Ho, W.T., Han, Y., Murdun, C., Mailloux, A.W., Zhang, L., Wang, X., Budhathoki, A., Pradhan, K., Rapaport, F., Wang, H., Shao, Z., Ren, X., Steidl, U., Levine, R.L., Zhao, Z.J., Verma, A., Epling-Burnette, P.K., 2017. Efficacy of ALK5 inhibition in myelofibrosis. JCI Insight 2. https://doi.org/10.1172/jci.insight.90932, e90932.

Zaleskas, V.M., Krause, D.S., Lazarides, K., Patel, N., Hu, Y., Li, S., Van Etten, R.A., 2006. Molecular pathogenesis and therapy of polycythemia induced in mice by JAK2 V617F. PLoS One 1, e18. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000018.

Zhou, W., Toombs, C.F., Zou, T., Guo, J., Robinson, M.O., 1997. Transgenic mice overexpressing human c-mpl ligand exhibit chronic thrombocytosis and display enhanced recovery from 5-fluorouracil or antiplatelet serum treatment. Blood 89, 1551–1559.

Zingariello, M., Martelli, F., Ciaffoni, F., Masiello, F., Ghinassi, B., D'Amore, E., Massa, M., Barosi, G., Sancillo, L., Li, X., Goldberg, J.D., Rana, R.A., Migliaccio, A.R., 2013. Characterization of the TGF-β1 signaling abnormalities in the Gata1low mouse model of myelofibrosis. Blood 121, 3345–3363. https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439661.

Objectif de la thèse

A l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de traitement efficace des NMP permettant de cibler le clone malin portant des *CALRmut*. L'objectif de ce travail est de comprendre les mécanismes activés par les CALRmut et en particulier impliqués dans les différences phénotypiques induites par les deux types de mutations les plus fréquentes *CALRdel52* et *CALRins5*, à l'aide de modèles de souris KI.

Afin de répondre à cette question, le travail a été divisé en 3 sous-objectifs :

1. Étude comparative de l'effet de *CALRdel52* et *CALRins5* sur hématopoïèse des souris KI

Après induction de l'expression des mutations *CALRdel52* et *CALRins5* chez la souris, les paramètres sanguins et l'effet des mutations sur les différentes populations du sang ont été suivis. À 10 mois post-induction, nous avons prélevé et analysé la MO et la rate de ces souris.

2. Étude de l'effet des *CALRmut* sur les CSH :

En nous basant sur l'impact des mutations sur l'amplification du compartiment des CSH et sur l'avantage compétitif des cellules mutées pour *CALRdel52* et *CALRins5,* nous avons étudié leur effet sur les divisions cellulaires des CSH.

Nous nous sommes ensuite intéressés à caractériser la CSH initiatrice de la maladie. Comme les *CALRmut* amplifient fortement la lignée mégacaryocytaire, nous avons voulu savoir si les mutations affectaient un type particulier de CSH biaisée vers la lignée mégacaryocytaire (vWF^+).

3. Mécanismes impliqués au niveau des CSH dans la différence de phénotype entre *CALRdel52* et *CALRins5* :

A l'aide de techniques « omics » nous avons étudié la signalisation (cytométrie de masse) et les signatures transcriptomiques (séquençage d'ARN à l'échelle unicellulaire) induites par les deux types de CALRmut dans les CSH.

Partie 1 - Étude comparative de l'effet de *CALRdel52* et *CALRins5* sur hématopoïèse des souris KI

Résumé du travail :

Pour comprendre l'impact physiopathologique des mutations *CALRdel52* et *CALRins5* sur l'hématopoïèse, le laboratoire a généré deux modèles de souris KI conditionnels inductibles exprimant une chimère CALR souris avec la queue C-terminale mutante humaine.

Lors de cette étude, nous avons observé que la mutation *CALRdel52* induit un phénotype plus sévère que *CALRins5* en termes de thrombocytose et d'évolution vers une fibrose, et qui est amplifié en contexte homozygote. Les souris KI *del52*, et à moindre effet les souris KI *ins5*, développent également une leucocytose, une splénomégalie, une hypocellularité de la MO, une amplification de la lignée mégacaryocytaire et l'expansion du compartiment des CSH auquel les deux mutations confèrent un avantage compétitif.

En conclusion, nos modèles de souris KI *del52* et *ins5* miment la pathologie humaine en induisant des changements phénotypiques différents, plus importants en contexte homozygote qu'hétérozygote.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

https://doi.org/10.1038/s41467-020-18691-3 OPEN

Calreticulin del52 and ins5 knock-in mice recapitulate different myeloproliferative phenotypes observed in patients with MPN

Camélia Benlabiod[1,2,3], Maira da Costa Cacemiro[1,2,3,4], Audrey Nédélec[5,6], Valérie Edmond[1,2,3], Delphine Muller[1,2,3], Philippe Rameau[7], Laure Touchard[8], Patrick Gonin[8], Stefan N. Constantinescu[5,6], Hana Raslova[1,2,3], Jean-Luc Villeval[1,2,3], William Vainchenker[1,2,3], Isabelle Plo[1,2,3,9] & Caroline Marty[1,2,3,9]✉

Somatic mutations in the calreticulin (*CALR*) gene are associated with approximately 30% of essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF). *CALR* mutations, including the two most frequent 52 bp deletion (*del52*) and 5 bp insertion (*ins5*), induce a frameshift to the same alternative reading frame generating new C-terminal tails. In patients, *del52* and *ins5* induce two phenotypically distinct myeloproliferative neoplasms (MPNs). They are equally found in ET, but *del52* is more frequent in PMF. We generated heterozygous and homozygous conditional inducible knock-in (KI) mice expressing a chimeric murine CALR del52 or ins5 with the human mutated C-terminal tail to investigate their pathogenic effects on hematopoiesis. Del52 induces greater phenotypic changes than ins5 including thrombocytosis, leukocytosis, splenomegaly, bone marrow hypocellularity, megakaryocytic lineage amplification, expansion and competitive advantage of the hematopoietic stem cell compartment. Homozygosity amplifies these features, suggesting a distinct contribution of homozygous clones to human MPNs. Moreover, homozygous *del52* KI mice display features of a penetrant myelofibrosis-like disorder with extramedullary hematopoiesis linked to splenomegaly, megakaryocyte hyperplasia and the presence of reticulin fibers. Overall, modeling *del52* and *ins5* mutations in mice successfully recapitulates the differences in phenotypes observed in patients.

[1] INSERM, UMR 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France. [2] Université Paris-Saclay, UMR 1287, Gustave Roussy, Villejuif, France. [3] Gustave Roussy, UMR 1287, Villejuif, France. [4] Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. [5] Ludwig Institute for Cancer Research, Brussels, Belgium. [6] de Duve Institute, Walloon Excellence in Life Sciences and Biotechnology (WELBIO), Université catholique de Louvain, Brussels, Belgium. [7] Integrated Biology Core Facility, Gustave Roussy, Villejuif, France. [8] Preclinical Research Plateform, Unité Mixte de Service AMMICA 3655/US 23, Gustave Roussy, Villejuif, France. [9] These authors contributed equally: Isabelle Plo, Caroline Marty. ✉email: caroline.marty@gustaveroussy.fr

Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are driven by the acquisition of somatic mutations in the hematopoietic stem cell (HSC) compartment leading to the constitutive activation of the JAK-STAT signaling pathway. Essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) are two disorders of the megakaryocytic lineage defined by an increased level of circulating platelets in ET and by megakaryocytic hyperplasia/dysplasia accompanied by the development of fibrosis in the bone marrow (BM) in PMF. PMF can display several other clinical features, including leukocytosis, splenomegaly, due to extramedullary hematopoiesis and anemia that may progress into pancytopenia. ET can evolve into a pre-fibrotic stage and overt secondary myelofibrosis (MF). The main driver mutations of ET and PMF are *JAK2*^{V617F}, mutations in the exon 9 of the calreticulin (*CALR*) gene, and in the thrombopoietin (TPO) receptor *MPL* gene[1–4]. Several *CALR* mutations have been reported and all induce a +1-base pair (bp) frameshift to an alternative reading frame leading to the replacement of the negatively-charged C-terminal tail to a new positively charged sequence with 34 residues common to all mutants. It was shown that CALR mutants specifically bind to and constitutively activate MPL, explaining the megakaryocyte (MK) phenotype of the *CALR*-mutated MPNs[5,6].

The two most frequent *CALR* mutations are a 52-bp deletion (*del52*) or type 1 and a 5-bp insertion (*ins5*) or type 2. The frequency of the two types of mutations is close in ET while *del52* and rarer type 1-like mutations are largely predominant in MF, thus, *del52* and *ins5* define two phenotypically distinct MPNs in human[7]. Retroviral (RV) modeling in mice has shown that the two types of human *CALR* mutations induce a MPL-dependent phenotype mimicking human disorders, but this approach presents pitfalls such as the ectopic over-expression of CALR mutants compared to endogenous wild-type (wt) CALR[8,9]. Several other models have been published including a human *del52* transgenic (TG) mouse[10], CRISPR-Cas9-mediated both murine *del19* and murine *del52*[11], and murine *del61* knock-in (KI) mice[12] as well as an inducible conditional KI expressing murine CALR with the human *del52*-mutated end tail[13]. Yet, none of these studies directly compare the effects of in vivo physiopathological expression of the two most frequent types of *CALR* mutations on hematopoiesis, nor do they specifically address the disease outcomes of ins5 or type 2-like mutant expression in mice.

Understanding the basis of the phenotypic differences induced by type 1 and type 2 mutations is of deep interest as their impact on the evolution of the disease and thus patient prognosis differ. In the present work, we conducted a direct comparison of the effects of heterozygous and homozygous physiopathological expression of del52 and ins5 mutants on hematopoiesis using inducible conditional KI mice. We chose to express chimeric mouse/human proteins based on the fact that mutated C-terminal tails of the two species display different amino acid composition and we thus generated these *del52* and *ins5* KI mice before the recent demonstration that the human and murine mutated C-terminal tails have close oncogenic properties[11,14]. Expression of del52 induces a stronger phenotype including thrombocytosis, leukocytosis, megakaryocytic and progenitor amplification as well as a penetrant fibrosis in spleen compared to ins5. Moreover, these phenotypes are both amplified by homozygosity suggesting a possible distinct contribution of the homozygous clone to the development and the extent of the human disorders. Thus, our KI mice recapitulate the human MPNs and provide powerful preclinical models to decipher the molecular bases of the differences between *del52* and *ins5* diseases.

Results

Generation of KI mice for *CALR del52* and *CALR ins5*. We used the FLEx strategy to generate conditional heterozygous mice carrying a floxed construct fusion of mouse *Calr* exons 8 and 9 followed with wild-type mouse *Calr* exon 8 and a modified exon 9 encompassing either the murine deletion of 52-bp (*CALR del52*) or a 5-bp insertion (*CALR ins5*) analogous to human mutations and the human mutated C-terminal sequence. To generate KI mice, floxed mice were crossed with SCL-CreER^{T} TG animals expressing a tamoxifen-inducible Cre. Thus, after induction of the KI allele expression by Cre recombinase these mice express heterozygous mouse CALR with human mutated C-terminal tail from its endogenous promoter (Fig. 1a, b). We purified BM lineage-negative (Lin^{-}) cell population for each KI model and measured CALR protein levels by Western blot (Fig. 1c). Using an antibody (Ab) (CALR-tot) that recognizes both CALR wt and mutants we mostly detected doublet bands at the expected CALR protein size that might reflect the presence of a cleaved product and/or protein post-translational modifications. Identical result was obtained using a different Ab clone (Supplementary Fig. 1a) and expression levels of three independent experiments were quantified (Supplementary Fig. 1b). We observed no difference in CALR expression between wt (+/+) and heterozygous +/*del52* and +/*ins5* cells. However, we noticed that in the absence of endogenous CALR wt (homozygous *del52/del52* and *ins5/ins5* cells) the amount of CALR mutant protein in cell lysate was lower (only significant with 1.8−fold less CALR del52 detected in *del52/del52* compared to +/+ cells) than in both wt and heterozygous cells. Using an Ab specifically directed against the mutated C-terminal tail (CALR-Cter) that does not detect endogenous CALR wt, there seems to be less CALR del52 than CALR ins5 in the homozygous cells, in accordance with the difference of protein levels revealed with the CALR-tot Ab. Surprisingly, we barely observed any band in the heterozygous cell lysates.

KI mouse phenotypes depend on the mutation and zygosity. Both *del52* and *ins5* KI mice developed a rapid thrombocytosis after induction by tamoxifen compared to wt (+/+) mice, but at higher levels in the presence of *del52* than in the presence of *ins5* (Fig. 2a, b, Supplementary Fig. 1c). Moreover, we observed that the thrombocytosis was more elevated in homozygous compared to heterozygous context. Both *del52* and *ins5* KI mice, especially in the homozygous context, also developed a significant leukocytosis (Fig. 2c, d). Compared to wt controls, hemoglobin levels were normal in all KI models except significantly lower in homozygous *del52* mice and starting to decrease in 7-month-old homozygous *ins5* mice (Fig. 2e, f).

Leukocytosis developed by KI mice, especially in the homozygous setting, was unexpected from *CALR*-mutated patient studies and was due to a general increase in the different white blood cell (WBC) populations (Supplementary Fig. 2a, b). There was a significant increase in neutrophils, lymphoid cells, and eosinophils. Monocytosis was higher in presence of *del52* than in the presence of *ins5*, while basophilia was more important in presence of *ins5* than *del52* (Supplementary Fig. 2a, b). The *del52* mutation was shown to lead to a general increase of various T lymphocyte sub-populations (Supplementary Fig. 3a, b).

Effect of the *CALR* mutations on the megakaryocytic lineage. We studied the effect of *del52* and *ins5* on the MK lineage, and observed a TPO-independent MK progenitor (CFU-MK) growth in heterozygous and homozygous *del52* and *ins5* KI mice, as stimulation by TPO induced only a significant increase of CFU-MK frequency in +/+ mice (Fig. 3a). Moreover, we measured the frequencies of MK progenitors (MkPs) and MKs (CD41^{+}CD42^{+}) in BM (Fig. 3b) and spleen (Fig. 3c) of KI mice by flow cytometry. We observed increased MkPs and MKs in *del52/del52* KI mice and to a lower extent for MkPs in *ins5/ins5* KI mice. Accordingly,

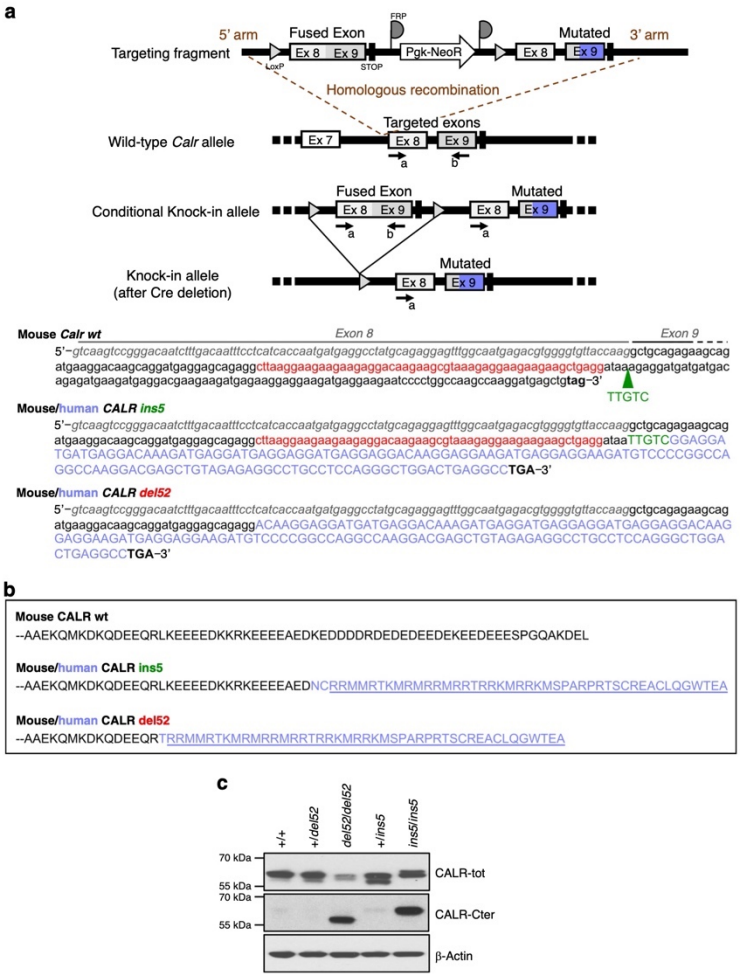


Fig. 1 Conditional *CALR del52* and *CALR ins5* KI mouse models. a Schematic representation of the wt and conditional KI alleles obtained after crossing the chimeras with flippase TG mice. KI allele was obtained after crossing mice with SCL-CreER^T TG mice and induction of Cre-mediated deletion of the wt fused exon 8 and 9 by tamoxifen, arrows are LoxP sites. The heterozygous and homozygous status of conditional KI mice was verified by DNA genotyping using a and b primers. A similar strategy was used to genotype conditional *ins5* and *del52* KI mice. Sequence of mouse *Calr* (lower cases) exon (Ex) 8 (italic gray) and Ex 9 (black) was depicted with the 52-bp (red) deleted in the mouse/human *CALR del52* chimera and the green arrow pointing to the position of the 5-bp insertion (TTGTC in green) in *CALR ins5*. Human sequence is depicted in upper cases and the purple sequence encodes the human mutated C-terminal tail. **b** Protein sequences of mouse CALR wt Ex 9, and CALR del52 and CALR ins5 mutated Ex 9. In black is mouse sequence and in purple human sequence with the common mutated C-terminus underlined. **c** Lin$^-$ cells isolated from BM of wt (+/+), heterozygous (+/*del52* or +/*ins5*) and homozygous (*del52/del52* and *ins5/ins5*) *CALR*-mutated KI mice were analyzed by Western blot for expression of CALR using an Ab directed against the N-terminus, common to both wt and mutant CALR (CALR-tot, Cell Signaling) and an Ab specific of the mutated C-terminal tail (CALR-Cter). ß-Actin was used as loading control. Blots shown are representative of at least three independent experiments. Source data are provided as a Source data file.

immuno-histological staining for von Willebrand factor (vWF) confirmed MK hyperplasia in BM (Fig. 3d) and spleen (Supplementary Fig. 4a) of homozygous *del52* mice while homozygous *ins5* mice mostly presented an apparent increase in the MK size and the number of MKs but only in the spleen. Milder phenotype was found with heterozygous *del52*. Independently of zygosity, all KI mice except +/*ins5* animals, displayed giant MKs with polylobulated nuclei suggesting increased modal ploidy. Indeed, in vivo MKs achieved a significantly higher zygosity-dependent ploidy in *del52* KI mice than in wt littermates (Fig. 3e). The mean ploidy of *ins5/ins5* MKs was identical to *del52/del52* MKs, both displaying also a modal ploidy of 32N compared to 16N in wt littermates (Supplementary Fig. 4b), while there was no marked difference between ploidy of +/*ins5* and wt MKs with the same

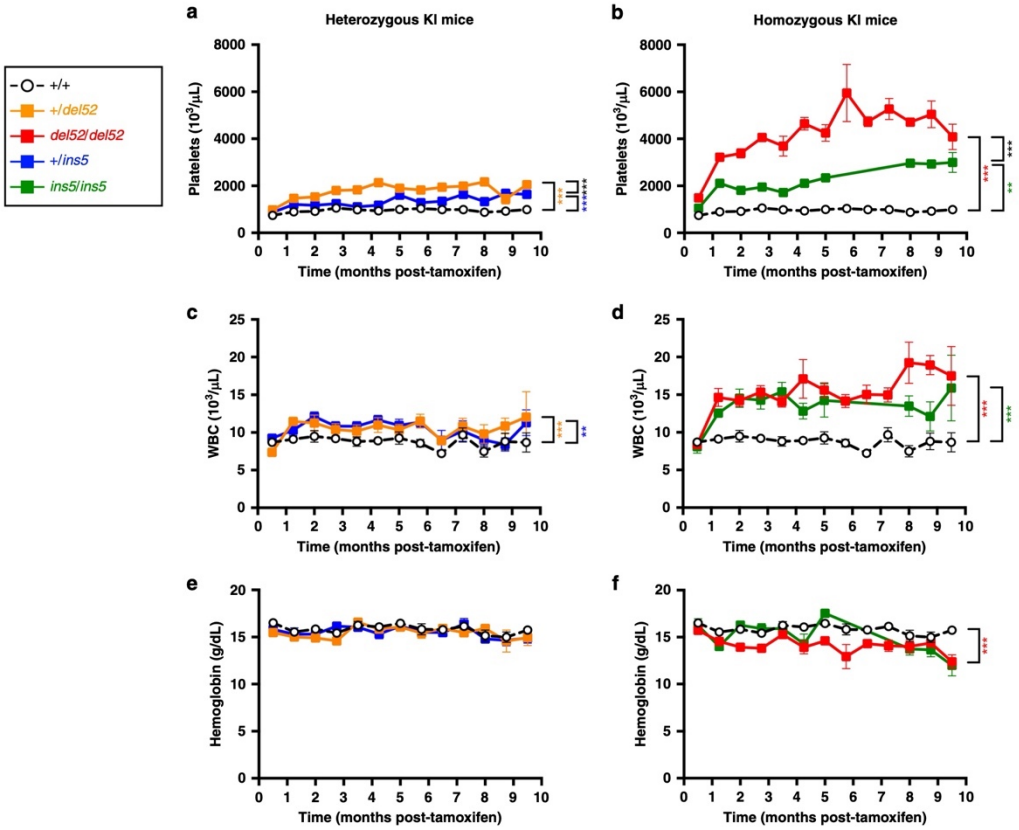
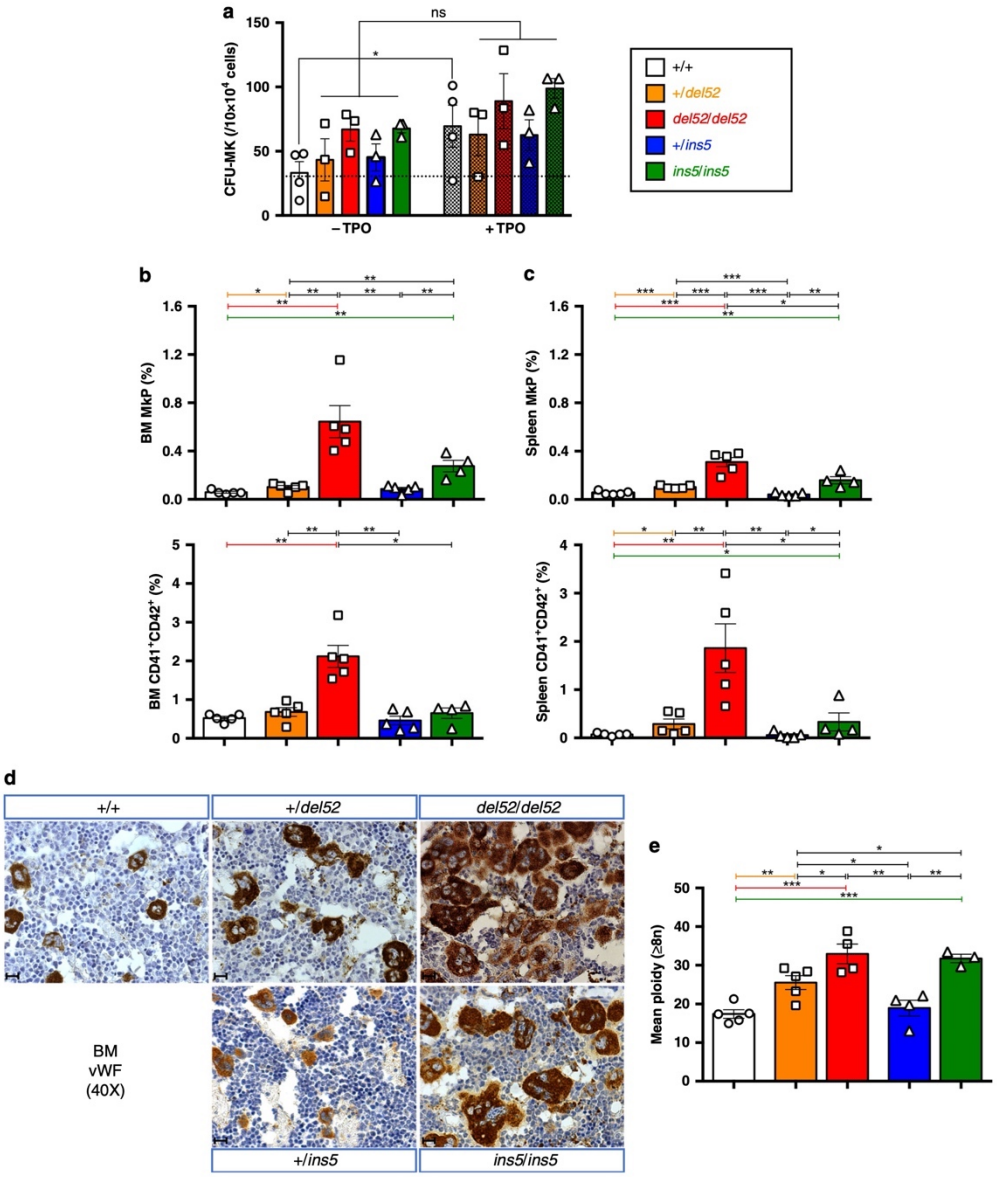


Fig. 2 Severity of KI mouse phenotype depends on the mutation and the zygosity. Blood parameters including **a**, **b** platelets, **c**, **d** WBC counts and **e**, **f** hemoglobin levels were determined in wt +/+ (open circles with connecting black dashed line, $n = 16, 18, 15, 11, 11, 8, 13, 7, 14, 11, 5, 6, 4$ for platelets, $n = 34, 25, 26, 25, 19, 18, 17, 12, 19, 13, 10, 13, 7$ for WBC and $n = 36, 26, 28, 25, 21, 19, 20, 11, 19, 11, 9, 14, 9$ for hemoglobin), heterozygous *+/del52* (orange squares and solid line, $n = 18, 20, 15, 12, 10, 7, 11, 7, 12, 12, 8, 5, 10$ for platelets, $n = 18, 19, 15, 13, 11, 7, 11, 7, 14, 11, 7, 5, 3$ for WBC and $n = 19, 20, 16, 13, 11, 8, 11, 7, 13, 9, 7, 5, 3$ for hemoglobin) and *+/ins5* (blue squares and solid line, $n = 20, 7, 13, 18, 11, 13, 10, 5, 4, 4, 5, 8, 7$ for platelets, $n = 21, 8, 12, 19, 11, 12, 10, 5, 5, 4, 5, 8, 9$ for WBC and $n = 20, 7, 12, 18, 11, 13, 13, 5, 5, 4, 5, 8, 7$ for hemoglobin) and homozygous *del52/del52* (red squares and solid line, $n = 14, 14, 10, 7, 6, 3, 8, 3, 7, 5, 3, 3, 4$ for platelets, $n = 14, 14, 10, 8, 7, 5, 8, 2, 7, 5, 4, 3, 4$ for WBC and $n = 16, 16, 10, 7, 7, 5, 8, 3, 7, 4, 3, 3, 4$ for hemoglobin) and *ins5/ins5* (green squares and solid line, $n = 6, 1, 6, 8, 9, 7, 5, 6, 5, 5$ for platelets, $n = 8, 1, 7, 9, 9, 6, 6, 6, 6, 4$ for WBC and $n = 6, 1, 7, 9, 9, 8, 5, 6, 5, 6$ for hemoglobin) mice after tamoxifen induction. *N* represents the number of individual mouse and varies depending on time of sampling during the course of the experiment, as indicated in the Source data file. Data are the means ± SEM. Significance was determined using ANOVA with Tukey's multiple comparison test: $^{**}p = 0.001$, $^{***}p \leq 0.0001$ (**a**, **b**); $^{**}p \leq 0.001$, $^{***}p = 0.0007$ (**c**); $^{***}p < 0.0001$ (**d**); $^{***}p = 0.0008$ (**f**). Source data are provided as a Source data file.

modal ploidy. However, in comparison to wt MKs, the 8N peak decreased in favor of the 32N peak in *+/ins5* MKs. These data suggest that *del52* induces a stronger amplification of MK progenitor cells compared to *ins5* (increase in MkP and MK numbers) while both mutations affect the late stages of megakaryopoiesis (increase in MK ploidy), indicating that CALR ins5 seems less effective than CALR del52.

***CALR del52* KI mice develop a myelofibrosis-like disease**. Mice were analyzed after 10 months of tamoxifen induction. There was a significant decrease in BM cellularity of *del52/del52* mice combined with an increase in spleen weight (Fig. 4a, b). There was barely a difference in the *+/del52*, *ins5/ins5*, and *+/ins5* mice compared to wt controls. In the *del52/del52* mice, the 4-fold increase in the frequency of giant MKs in the BM (Fig. 3) may partially explain the decrease in BM cellularity. Moreover, in the BM of *del52/del52* mice, we observed a decrease in the frequencies of both erythroid progenitors (BFU-E) and erythroblasts (Ter-119$^+$) (Supplementary Fig. 5a) with no noticeable change in granulo-monocytic progenitors (CFU-GM) and granulocyte precursors (Mac1$^+$Gr1$^+$) (Supplementary Fig. 5c) or the lymphoid cells (CD3$^+$ and B220$^+$) (Supplementary Fig. 5e). Histological examination by silver staining showed a very mild MF in *del52/del52* mice but no significant development of reticulin fiber network in the BM of any other KI mice (Fig. 4c, BM, reticulin silver (RET) staining), but we observed a neo-osteogenesis only in rare cases of *del52/del52* mice.



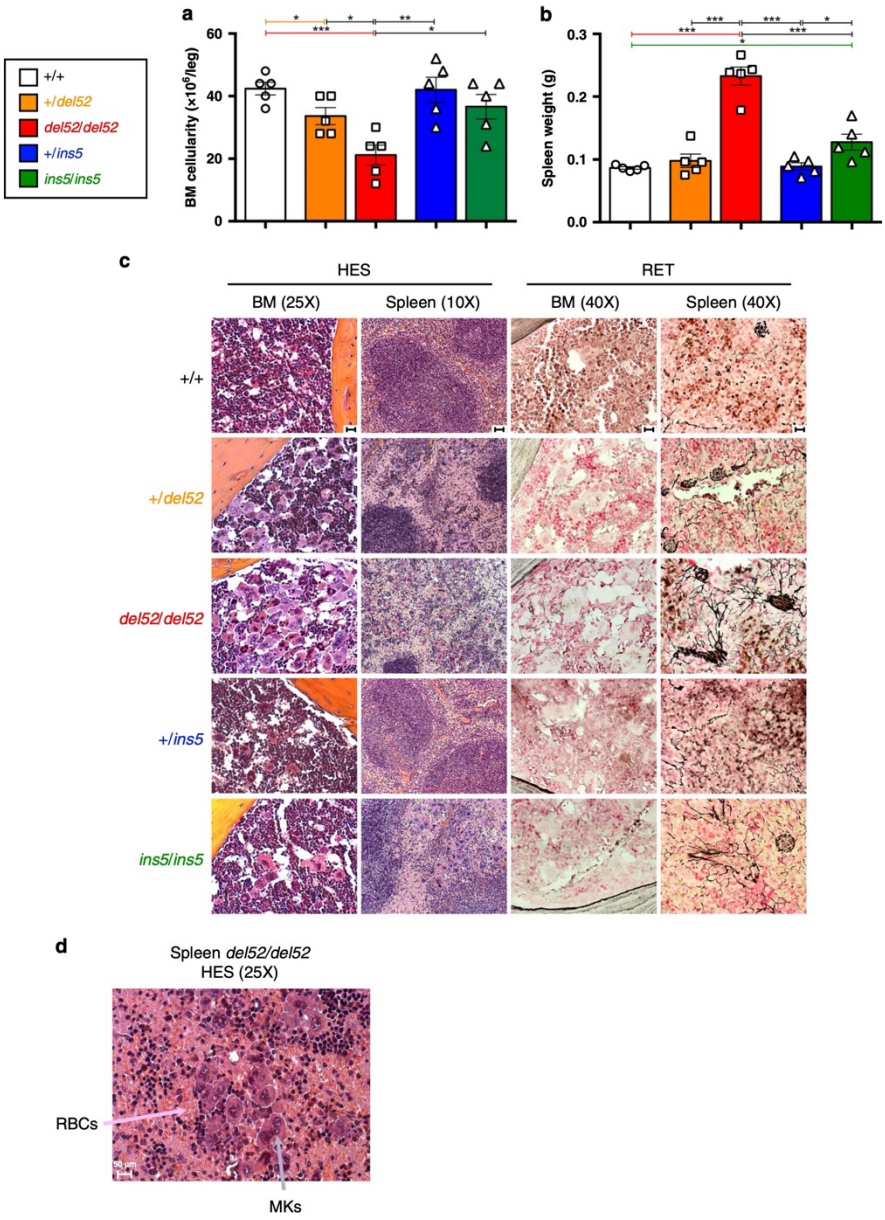
The unexpected quasi-absence of fibrosis in BM, particularly of homozygous *del52* KI mice that present an important MK hyperplasia confirmed on hematoxylin/eosin/safran (HES) staining (Fig. 4c), prompted us to explore fibrosis in spleen. Histology revealed the presence of a thicker reticulin fiber network in homozygous *del52* compared to wt spleen, and in a less penetrant fashion in homozygous *ins5* KI mice (Fig. 4c, Spleen, RET). Spleen structure was partially disorganized in the +/*del52* and *ins5*/*ins5* KI mice and, in *del52*/*del52* KI mice, white pulp territories were almost lost (Supplementary Fig. 6), attributable to a strong MK hyperplasia (Fig. 4c, Spleen, HES) and an increase in RBCs (Fig. 4d) that was confirmed by semi-solid cultures and flow cytometry analysis at the progenitor and erythroblast levels (Supplementary Fig. 5b). An increase in granulo-monocytic lineage cells was also observed only in *del52*/*del52* KI spleens (Supplementary Fig. 5d), explaining the higher spleen weights of these mice compared to the three other phenotypes and the wt littermates (Fig. 4b). Disorganization of

Fig. 3 Amplification of the megakaryocytic lineage in KI mice. a Frequencies of BM megakaryocytic progenitors (CFU-MKs) with or without TPO of ≥10 months post-tamoxifen KI mice were represented as means ± SEM ($n = 4$ individual +/+ mice and $n = 3$ mice for heterozygous and homozygous genotypes). In the figure, white is used for +/+, orange for *+/del52*, red for *del52/del52*, blue for *+/ins5* and green for *ins5/ins5* genotypes. Significance of +TPO (hatched histograms) compared to the −TPO (solid histograms) condition was assessed using a two-sided parametric paired *t*-test (*$p = 0.0192$; ns not significant). **b**, **c** Frequencies of megakaryocytic progenitors (MkPs, Lin$^-$c-Kit$^+$Sca-$^-$CD150$^+$CD41$^+$) and MKs (CD41$^+$CD42$^+$) in **b** BM and **c** spleen cells from +/+, *+/del52*, and *del52/del52* compared to *+/ins5* and *ins5/ins5* mice ≥10 months after tamoxifen induction were expressed as means ± SEM ($n = 5$ individual mice except $n = 4$ *ins5/ins5* mice). Significance for MkPs was calculated with a two-sided parametric *t*-test and for MKs with a two-sided nonparametric Mann–Whitney test. In **b**, *$p = 0.023$; **$p = 0.0023$ (+/+ vs. *del52/del52*), 0.0016 (+/+ vs. *ins5/ins5*), 0.0036 (*+/del52* vs. *del52/del52*), 0.0063 (*+/del52* vs. *ins5/ins5*), 0.0031 (*del52/del52* vs. *+/ins5*), 0.004 (*+/ins5* vs. *ins5/ins5*) in MkP analysis and *$p = 0.0159$; **$p = 0.0079$ in CD41$^+$CD42$^+$ analysis. In **c**, *$p = 0.0213$ (*del52/del52* vs. *ins5/ins5*); **$p = 0.0058$ (+/+ vs. *ins5/ins5*), 0.003 (*+/ins5* vs. *ins5/ins5*); ***$p = 0.0007$ (+/+ vs. *+/del52*), 0.0002 (+/+ vs. *del52/del52*), 0.0008 (*+/del52* vs. *del52/del52*), <0.0001 (*+/del52* vs. *+/ins5*), 0.0001 (*del52/del52* vs. *+/ins5*) in MkP analysis and *$p = 0.0159$ (+/+ vs. *+/del52*), 0.0238 (+/+ vs. *ins5/ins5*), 0.0317 (*del52/del52* or *+/ins5* vs. *ins5/ins5*); **$p = 0.0079$ in CD41$^+$CD42$^+$ analysis. **d** BM MKs were immunostained for vWF. Images were obtained using a DM2000 Leica microscope and a DFC300FX Leica camera with Leica Application Suite v.2.5,OR1 acquisition software (×40 magnification). Scale bars represent 50 µm. Similar results were obtained with analyzing at least three independent mice for each genotype. **e** Mean ploidy of ≥8N MKs from ≥10 months post-tamoxifen KI mice was expressed as means ± SEM ($n = 5$ individual +/+ and *+/del52* mice, $n = 4$ *del52/del52* and *+/ins5* mice and $n = 3$ *ins5/ins5* mice). Statistical significance was determined using a two-sided parametric *t*-test: *$p = 0.0453$ (*+/del52* vs. *del52/del52*), 0.0454 (*+/del52* vs. *+/ins5*), 0.0498 (*+/del52* vs. *ins5/ins5*); **$p = 0.0047$ (+/+ vs. *+/del52*), 0.0052 (*del52/del52* vs. *+/ins5*), 0.0042 (*+/ins5* vs. *ins5/ins5*); ***$p = 0.0005$ (+/+ vs. *del52/del52*), 0.00001 (+/+ vs. *ins5/ins5*). Source data are provided as a Source data file.

white pulp in spleens of homozygous *del52* and, to a lesser extent, *ins5* animals was accompanied with a decrease in the frequencies of lymphocytes, but their absolute numbers increased non-significantly relative to splenomegaly (Supplementary Fig. 5f). These results show that *del52/del52* in contrast to *ins5/ins5* mice present early signs of myelofibrosis characterized by a BM cellularity decrease, splenomegaly and extramedullary hematopoiesis even if distinct reticulin fibers could not be significantly detected in the BM in contrast to the spleen.

Phenotype severity depends on MPL/JAK2/STAT activation. Since fibrosis was milder in BM compared to spleen, we tested whether CALR del52 might induce a weaker signaling in BM compared to spleen MKs by phosphoflow. CALR del52 induced the constitutive phosphorylation of STAT5 in homozygous BM MKs compared to wt (+/+) littermate BM MKs that was dependent on JAK2 as level returned to basal with the JAK1/2 inhibitor ruxolitinib (Supplementary Fig. 7a). Interestingly, TPO stimulation of *del52/del52* MKs increased the level of phosphorylated STAT5 suggesting that at least a certain amount of MPL was accessible for TPO binding in presence of CALR del52. However, we did not observe any obvious difference between del52-induced phosphorylation of STAT5 in BM compared to spleen MKs. In our mice, the KI allele encodes the murine (mu) CALR ins5 or del52 with human (hu) mutated C-terminal tail. In order to determine the efficacy of these chimeric (chim) CALR mutants, compared to hu CALR del52 and ins5, to activate the mu MPL, we measured STAT5 activation by luciferase assay in γ2A cells. In this system, mu MPL was indistinctively and spontaneously (−TPO) activated by chim CALR del52, chim CALR ins5, hu CALR del52 and hu CALR ins5 (Fig. 5a). As previously shown for the hu CALR mutants, the chim CALR mutants were also less efficient in constitutively activating mu MPL compared to hu MPL. As expected, stimulation of mu/hu MPL with TPO abolished the differences in STAT5 activation in presence of any of the CALR mutants and CALR wt. In order to verify whether the mild MF phenotype developed by *del52/del52* KI mice was due to sub-optimal stimulation of mu MPL by the chim CALR del52 protein, we treated 1 month post-induction homozygous KI mice with the MPL agonist romiplostim, that was previously reported to induce MF in wt mice[15]. The romiplostim-treated homozygous *del52* KI mice developed a significant BM hypocellularity and splenomegaly compared to treated wt littermates (Fig. 5b) accompanied with an increase in platelets, WBC, and slight anemia (Supplementary Fig. 7b) possibly indicating the development of MF. Romiplostim treatment induced MK hyperplasia revealed by vWF immunostaining and fibrosis with the presence of black reticulin fibers in both BM and spleen of wt and, to a stronger extent, of *del52/del52* mice (Fig. 5c). Taken together, this suggests that the *del52/del52* KI mice develop a fibrosis in both BM and spleen linked to a constitutive stimulation of mu MPL, but mild as this activation is weak.

Amplification of the HSC compartment in KI mice. The study of the different cell compartments suggested that *del52* may provide a stronger advantage to HSC (Lin$^-$Sca-1$^+$c-Kit$^+$CD48$^-$CD150$^+$, called SLAM) than *ins5*. In homozygous KI mice after 10 months post-induction, there was a significant amplification of HSC in both BM and spleen that was stronger in presence of *del52* compared to *ins5* (Fig. 6a and Supplementary Fig. 8). An increasing trend was observed in *+/del52* mice while *+/ins5* was very similar to controls. To decipher the effect of both mutations in the HSC compartment, we performed a competitive BM transplantation with increasing percentages of non-induced homozygous *del52* or homozygous *ins5* cells with wt GFP$^+$ cells into lethally irradiated recipient mice (Fig. 6b). One month after transplantation KI expression was induced by tamoxifen. *Del52*-engrafted mice developed a higher dose-dependent thrombocytosis (Fig. 6c) and leukocytosis (Fig. 6d) than *ins5*-engrafted mice and no change in hemoglobin (Supplementary Fig. 9). After 4 months, thrombocytosis developed by mice engrafted with 100% and 75% of mutated cells reached similar levels than the respective age-related (4–5 months post-induction) native *del52/del52* and *ins5/ins5* mice (Fig. 2b). In contrast to *del52*-engrafted mice, there was no obvious development of a disease at 4 months with <50% of *ins5*-engrafted cells. Evolution of mutated cells was followed in blood platelets, granulocytes and erythrocytes. The homozygous del52 BM cells were able to outcompete wt BM cells from as low as an initial 10% competitive engraftment, reaching 100% at 4 months with a delay in the erythrocytes likely due to the longer half-life of these cells (Fig. 7a). In contrast, competition by *ins5* BM cells was slower especially when <50% of mutated cells were initially engrafted (Fig. 7b) suggesting that *del52* provides a stronger selective advantage than *ins5* to the HSC. Especially, percentages of *ins5*-mutated cells engrafted at 10% and 25% followed over a 4-month period after KI induction were visibly below values for similar amounts of engrafted *del52*-mutated



cells. Similarly, 4 months after induction of KI expression, HSC-enriched BM cell populations ($Lin^{-}Sca\text{-}1^{+}c\text{-}Kit^{+}$/LSK and SLAM) were 100% *del52*-mutated independently of the initial ratio engrafted while for initial ratios of 25% and 10% *ins5* BM cells, HSC populations still contained wt cells (Fig. 7c). More interestingly, the frequencies of SLAM in BM dose-dependently increased with higher initial amounts of transplanted *del52/del52* BM cells whereas frequencies of *ins5/ins5* SLAM remained independent of the initial percentages of engrafted mutated BM cells, suggesting a *del52*-induced increase in HSC symmetric division compared to *ins5* (Fig. 7d). Taken together these results suggest that both *del52* and *ins5* provide a competitive advantage to HSC but *del52* induces a stronger amplification of the HSC compartment than *ins5*.

Fig. 4 BM and spleen features of KI mice. a BM cellularity and **b** Spleen weight of ≥10 months post-tamoxifen KI mice were expressed as means ± SEM ($n = 5$ different mice for each genotype). In the figure, white is used for +/+, orange for *+/del52*, red for *del52/del52*, blue for *+/ins5* and green for *ins5/ins5* genotypes. Significance was calculated with a two-sided parametric *t*-test. In **a**, $*p = 0.032$ (+/+ vs. *+/del52*), 0.0183 (*+/del52* vs. *del52/del52*), 0.0163 (*del52/del52* vs. *ins5/ins5*); $**p = 0.036$ (*del52/del52* vs. *+/ins5*); $***p = 0.0005$ (+/+ vs. *del52/del52*) and in **b**, $*p = 0.0126$ (+/+ vs. *ins5/ins5*), 0.0238 (*+/ins5* vs. *ins5/ins5*); $***p < 0.0001$ except $p = 0.0006$ for *del52/del52* vs. *ins5/ins5*. Source data are provided as a Source data file. **c** Histopathology of BM and spleen showing HES and RET stainings of ≥10 months post-tamoxifen mice. **d** HES staining showing MK hyperplasia and increase in red blood cells (RBCs) in spleen of homozygous *del52/del52* mouse. Images were obtained using a DM2000 Leica microscope and a DFC300FX Leica camera with Leica Application Suite v.2.5,OR1 acquisition software (×10, ×25, and ×40 magnifications). Scale bars represent 50 µm. Similar results were obtained with analyzing at least three independent mice for each genotype.

Role of homozygosity in the expansion of *CALR ins5* HSCs. On one hand, platelet counts were reported to be higher in *ins5*-ET than in *del52*-ET patients[16,17] and, on the other hand, homozygous clones are more frequently found in *ins5*- than in *del52*-mutated patients[2,3,18,19]. Thus, we decided to investigate how homozygous *ins5* cells might out-compete heterozygous *ins5* cells at the HSC level and how it would affect platelet levels knowing that thrombocytosis in homozygous *ins5/ins5* mice was significantly superior than in heterozygous *+/del52* mice (Fig. 8a). In order to test the effect of *ins5* homozygosity on the severity of the disease, we performed a competitive transplantation of 20% of *ins5/ins5* with 80% of *+/ins5* BM cells into lethally irradiated recipient mice. One month after transplantation, KI expression was induced by tamoxifen. As expected, mice engrafted with 100% heterozygous *del52* cells displayed higher platelet counts than 100% heterozygous *ins5*-transplanted mice, compared to engraftment control with 100% wt (+/+) cells (Fig. 8b). In the presence of limited homozygous *ins5* cells with heterozygous *ins5* cells, mice developed a significant stronger thrombocytosis than mice engrafted with 100% of heterozygous *ins5* cells, and surpassed, but not significantly, the 100% heterozygous *del52* model. Six months after KI induction, the percentage of *ins5/ins5* HSCs (SLAM) after single SLAM cell sorting and genotyping of colonies had doubled compared to initially engrafted BM cell levels (Fig. 8c) showing that homozygous *ins5* cells can outcompete heterozygous *ins5* cells and may play an important role in the extent of thrombocytosis.

Discussion

We report here a direct comparison of the effects of physiological expression of the two most frequent *CALR* mutations, *del52* and *ins5*, on hematopoiesis. *Del52* KI mice developed a more severe thrombocytosis than *ins5* KI mice and in the homozygous than in the heterozygous status. The majority of platelet increase in homozygous *del52* KI mice seems to be due to an increase in both the number and the size of MKs, while homozygous *ins5* and heterozygous *del52* thrombocytosis was mostly due to an increase in MK size, confirmed by an increased ploidy.

The extent of thrombocytosis developed by KI mice was related to the zygosity status of the mutations, as observed for *del52* by Li et al.[13]. The strategies used to generate the two KI models were different but result in the same chimera sequence (Supplementary Fig. 10). This suggests that the magnitude of thrombocytosis is dependent on the amount of CALR mutants and probably on the ratio of CALR mutant to CALR wt. Of note, CALR del52 and CALR ins5 proteins were barely detectable in heterozygous KI cells, may be due to the role of CALR wt in the stability of the mutants and/or increased secretion. It is interesting to highlight that with 100% mutated HSCs, *CALR*-mutated KI mouse models are more closely related to patients than *JAK2*^{V617F} KI mice because *CALR*-mutated, in contrast to *JAK2*^{V617F}-patients, display a high allele burden (30–50%) at the HSC/progenitor level suggesting that most HSCs need to be mutated for disease development[20]. In contrast to our KI and RV mouse models[8], levels of platelets in *ins5*-ET patients were reported to be higher than in *del52*-ETs[16,17]. Several hypotheses may explain the apparent difference in the levels of *del52- versus ins5*-induced thrombocytosis in patients compared to mice. First, in agreement with the observations performed in mice, one study reported that CD34$^+$ progenitors transduced to express del52 generated more proplatelets than with ins5[21]. Second, in the mouse models, we can follow a time-dependent development of thrombocytosis, correlating with HSC/MkP amplification. Platelet counts start decreasing when *del52* mice display signs of MF-like features. In both mice and patients, *CALR* mutations induce a continuum of diseases between ET, pre-fibrosis, and PMF with fluctuating platelet levels. While *ins5* ETs present slightly higher platelet counts than *del52* ETs, this difference is not further observed in MF[17]. In particular, *del52* ETs are more inclined to progress towards MF than *ins5* ETs, thus suggesting more heterogeneity in platelet counts for *del52* patients. Although allele burden in *CALR*-mutated patients often tends to be close to 50% when disease declare, it would be interesting to compare platelet levels in *del52* and *ins5* ETs with similar and low allele burden and to follow progression of thrombocytosis to measure the real impact of these two mutations on platelet counts. Third, it was reported that homozygous *CALR* mutations, although they are rare, were rather *ins5* and type 2-like than *del52* and type 1-like mutations[2,3,18,19]. In ET patients, homozygous *ins5* is frequently restricted to a small fraction of progenitors, but may contribute to high level of thrombocytosis. In favor of this hypothesis, when engrafting limited amount of homozygous *ins5* cells with heterozygous *ins5* cells in mice, the platelets counts undeniably exceeded levels reached by 100% heterozygous *ins5*-engrafted mice, and more interestingly, by 100% heterozygous *del52*-engrafted mice. In this model, the homozygous *ins5* HSC reached 40% when thrombocytosis surpassed levels reached by the heterozygous *del52* engrafted mice. In patients, the homozygous clone is lower, ranging from 2 to 25% in the CD34$^+$ cell population, but it cannot be excluded that it is specifically amplified in the MK/platelet lineage. Thus, our study may provide a preliminary explanation on the apparent contrast between the *del52* and *ins5* thrombocytosis phenotype in mouse compared to human. Therefore, it will be important to correlate platelet counts with the percentages of homozygous *CALR*-mutated MKs or at least with the global *CALR*-mutated allele burden in MKs.

In contrast to *CALR*-mutated patients who show little leukocytosis compared to *JAK2*^{V617F} NMPs, we observed that *del52* and, to a slightly lesser extent, *ins5* KI mice develop leukocytosis that is dependent on zygosity. In a similar manner, Li J *et al* also showed a slight increase in WBC in heterozygous *del52* KI mice, more reproducible and significantly higher in homozygous animals[13]. Similarly to heterozygous *del52* KI mice, there was a moderate leukocytosis in the CRISPR-Cas9-mediated murine *del52* KI mice[12], while no change in WBC counts was seen in the human *del52* TG and the CRISPR-Cas9-mediated murine *del61* and murine *del19* KI mice[10–12]. We show here that the increased WBC population in *del52* and *ins5* homozygous KI mice includes

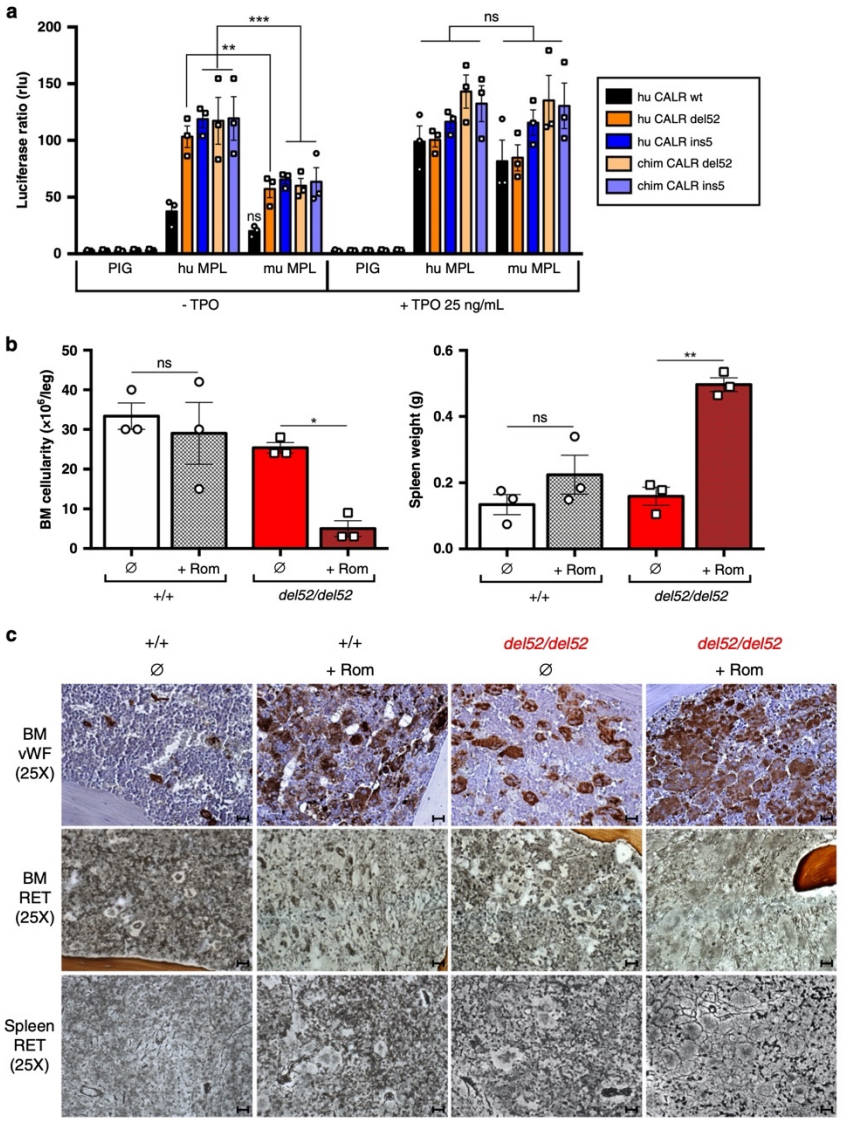


Fig. 5 Degree of activation of MPL/JAK2/STAT determines the phenotype. a The γ2A cells were transfected to express JAK2, mu MPL, hu MPL or an empty vector (PIG) and equal amounts of either the hu CALR wt (black), del52 (dark orange) or ins5 (dark blue) or the chim CALR del52 (light orange) or ins5 (light blue), as indicated. STAT5-dependent transcriptional activity with or without TPO was measured 24 h after transfection by the dual firefly luciferase system with Spi-Luc reporter (STAT5 response elements) and renilla pRL-TK reporter with constitutive expression, as an internal control. Shown are means ± SEM of three independent experiments in triplicate. Significance was assessed using Tukey's multiple comparison test (**$p = 0.026$; ***$p = 0.0004$ (hu CALR ins5), 0.0001 (chim CALR del52), 0.0002 (chim CALR ins5); ns not significant). **b** BM cellularity and spleen weight of 1 month post-tamoxifen *del52/del52* KI mice (red) and wild-type (+/+) littermates (white) treated with romiplostim (+Rom, hatched histograms) or not (Ø, solid histograms). Data are means ± SEM ($n = 3$ different mice) and significance of +Rom to Ø condition was assessed using a two-sided parametric paired *t*-test: *$p = 0.0198$; **$p = 0.0017$; ns: not significant. Source data are provided as a Source data file. **c** BM and spleen were examined after vWF immunostainning and RET staining. Images were obtained using a DM2000 Leica microscope and a DFC300FX Leica camera with Leica Application Suite v.2.5,OR1 acquisition software (×25 magnifications). Scale bars represent 50 µm. Similar results were obtained with analyzing three independent mice for each condition.

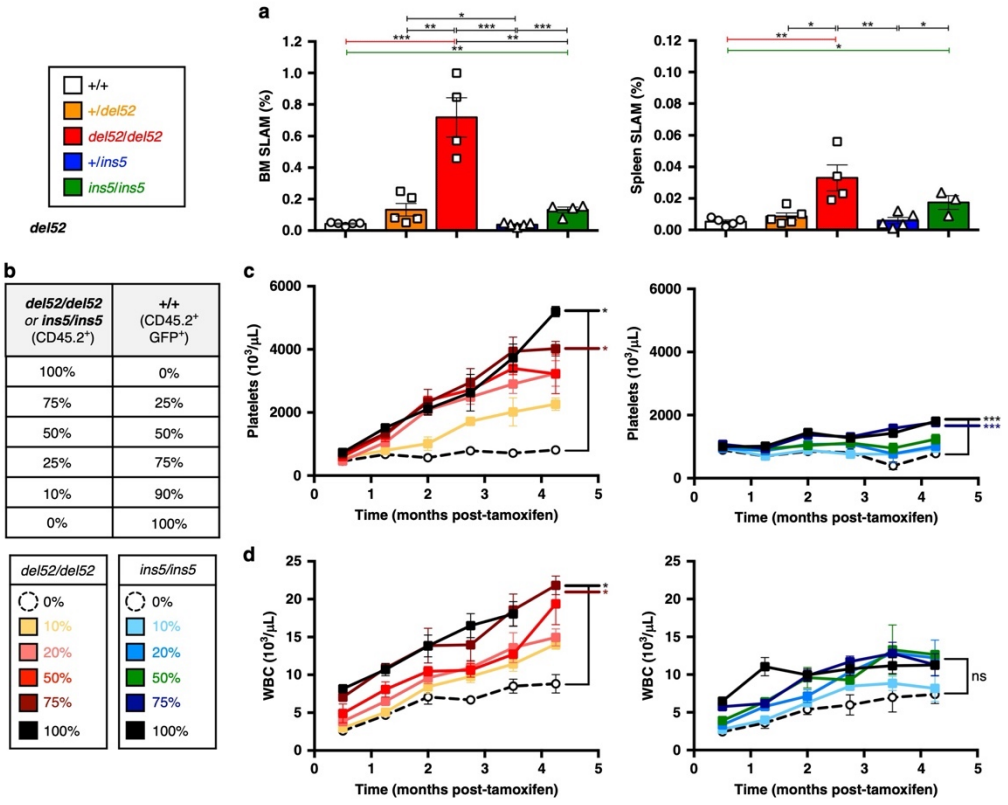
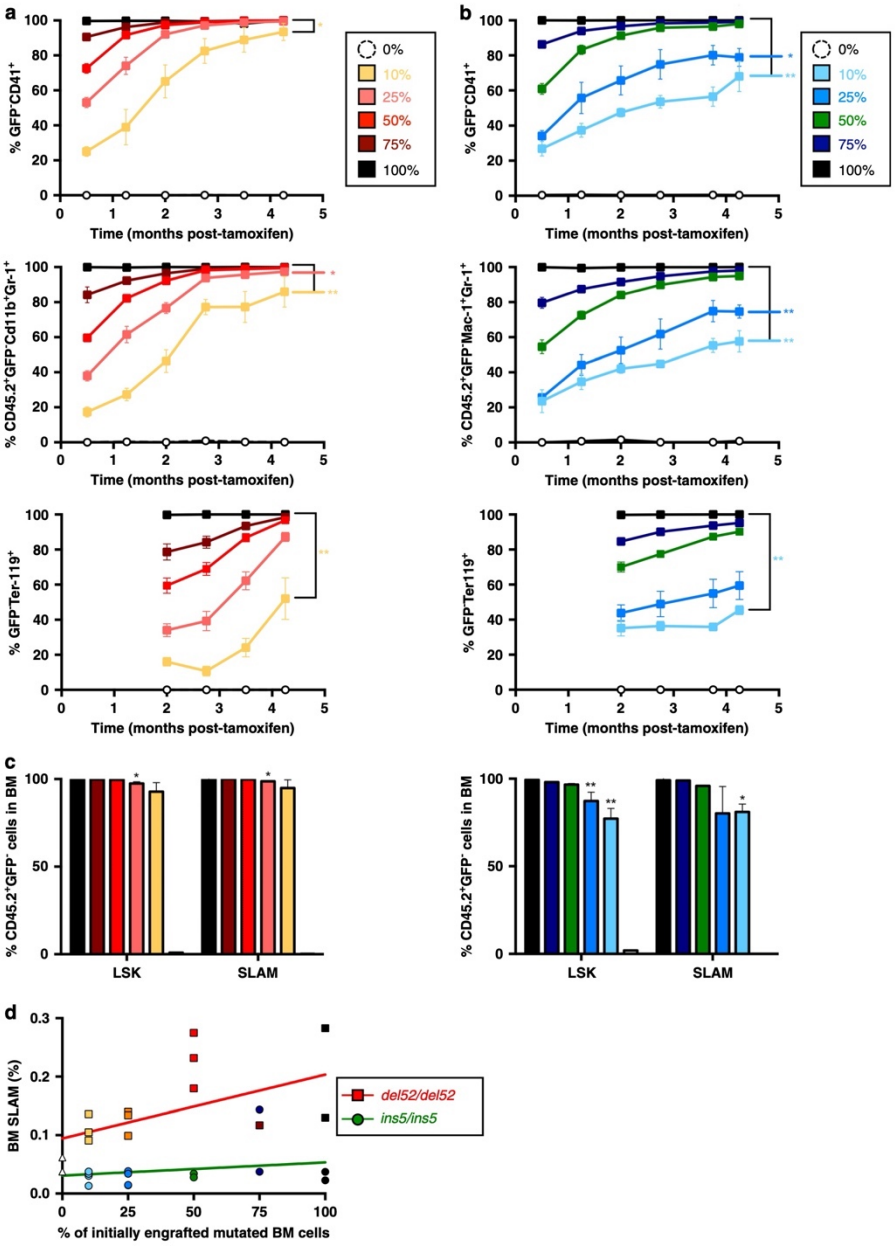


Fig. 6 Effect of *CALR del52* and *CALR ins5* on the HSCs. a Percentages of HSCs (SLAM, Lin$^-$c-Kit$^+$Sca-$^+$CD150$^-$CD48$^+$) in BM and spleen of ≥10 months post-tamoxifen mice were expressed as means ± SEM ($n = 5$ independent mice of +/+ (white), +/del52 (orange) and *+/ins5* (blue) genotypes; $n = 4$ *del52/del52* (red) mice and for *ins5/ins5* (green) genotype $n = 4$ for BM and $n = 3$ for spleen analyses). Significance was determined using a two-sided parametric *t*-test: in BM, $^*p = 0.047$; $^{**}p = 0.0012$ (+/+ vs. *ins5/ins5*), 0.0016 (*+/del52* vs. *del52/del52*), 0.0034 (*del52/del52* vs. ins5/ins5); $^{***}p = 0.0004$ except 0.0009 for *+/ins5* vs. *ins5/ins5* and in spleen, $^*p = 0.0157$ (*+/del52* vs. *del52/del52*), 0.0131 (+/+ vs. *ins5/ins5*); $^{**}p = 0.0071$ (+/+ vs. *del52/del52*), 0.0094 (*del52/del52* vs. *+/ins5*), 0.0334 (*+/ins5* vs. *ins5/ins5*). **b** To investigate the effect of *CALR del52* and *CALR ins5* on HSCs we engrafted different ratios of homozygous *del52/del52* (yellow, pink, red, brown and black squares and solid lines) and *ins5/ins5* (turquoise, blue, green, dark blue and black squares with solid lines) CD45.2$^+$ KI BM cells with wild-type (+/+) CD45.2$^+$ GFP$^+$ BM cells in CD45.1$^+$ lethally irradiated mice. Four weeks after transplantation, KI allele expression was induced by tamoxifen and **c** platelet and **d** WBC counts were measured. Data are the means ± SEM, *del52/del52* platelets: $n = 4, 4, 2, 4, 4, 3$ for 0%, $n = 4, 4, 3, 3, 3, 3$ for 10%, $n = 5, 4, 5, 4, 4, 4$ for 25%, $n = 5, 5, 4, 5, 5, 4$ for 50%, $n = 3, 4, 4, 3, 4, 3$ for 75% and $n = 5, 5, 5, 3, 5, 2$ for 100%; *ins5/ins5* platelets: $n = 3, 3, 3, 1, 3, 3$ for 0%, $n = 5, 4, 3, 4, 2, 4$ for 10%, $n = 5, 5, 5, 4, 2, 3$ for 25%, $n = 5, 5, 3, 4, 3, 5$ for 50%, $n = 5, 5, 3, 4, 3, 5$ for 75% and $n = 5, 5, 3, 4, 4, 5$ for 100%; *del52/del52* WBC: $n = 4, 4, 3, 4, 4, 4$ for 0%, $n = 4$ for 10%, $n = 5, 4, 5, 5, 4, 5$ for 25%, $n = 5, 5, 5, 5, 5, 4$ for 50%, $n = 4, 4, 4, 3, 4, 4$ for 75% and $n = 5, 5, 5, 4, 5$ for 100%; *ins5/ins5* WBC: $n = 3, 3, 3, 2, 3, 3$ for 0%, $n = 5, 5, 4, 4, 5, 5$ for 10%, $n = 5, 5, 5, 5, 3, 4$ for 25%, $n = 5, 5, 5, 5, 3, 5$ for 50%, $n = 5, 5, 3, 5, 4, 5$ for 75% and $n = 5, 4, 5, 5, 5, 5$ for 100%. *N* represents individual mice and varies depending on time of sampling during the course of the experiment and on the group defined as the percentage of engrafted homozygous cells, as indicated in the Source data file. Significance compared to the 0% condition (open circles with connecting black dashed line) was determined using ANOVA with Dunnett's multiple comparison test and a nonparametric Kruskal–Wallis's multiple comparison test for *ins5/ins5* WBC. In **c**, $^*p = 0.0172$ (100%), 0.0256 (75%); $^{***}p = 0.0001$ (100% and 75%) and in **d**, $^*p = 0.0422$ (100%), 0.0128 (75%); ns not significant. Source data are provided as a Source data file.

neutrophils, B and T lymphocytes, natural killer (NK) cells and eosinophils as well as monocytes and basophils that were differentially regulated by CALR del52 and ins5. The increase in neutrophils in *del52* KI mice could be the consequence of activation of the G-CSF receptor by CALR mutants[5]. Moreover, as homozygous *ins5* patients were reported to present a deficiency in both the neutrophil myeloperoxidase (MPO) and the eosinophilic peroxidase (EPX)[22], it could be expected to see neutropenia in mice placed in a pathogen-challenged environment. Of particular interest, our KI models present high levels of circulating lymphocytes, especially of various sub-types of T cells. However, it is difficult to know whether this increase results from CALR mutant immunogenicity and the activation of lymphocytes. This hypothesis is a matter of debate as work from collaborators shows



that CALR del52 has an immunosuppressive effect[23] and causes a down-regulation of MHC-I endogenous antigen loading and presentation[24] but CALR mutant epitopes were also shown to stimulate $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells in patients[25,26]. Importantly, in contrast to $JAK2^{V617F}$, which is detected at a low level in lymphoid cells and rarely in T lymphocytes from MPN patients, *CALR* mutations are present in the majority of monocytes and NK cells and frequently detected in T lymphocytes, most likely owing to the effect of both *del52* and *ins5* on HSC expansion. Thus, the presence of *CALR* mutations in lymphoid cells might also have a direct effect on their expansion or their blood trafficking that should be investigated in the future.

Fig. 7 Evolution of homozygous *del52* and *ins5* cells in blood and BM cells. Percentages of **a** *del52/del52* (yellow, pink, red, brown and black squares and solid lines) and **b** *ins5/ins5* (turquoise, blue, green, dark blue and black squares with solid lines) mutated KI cells in platelets ($CD41^+$) and erythroid ($Ter\text{-}119^+$) blood cells was determined as GFP^- cells and in granulocytes ($Cd11b^+Gr\text{-}1^+$) as $CD45.2^+GFP^-$ cells, and are expressed as means ± SEM (in **a**: $n = 4$ for 0%, n = 4 GFP^-CD41^+, $n = 4, 4, 4, 2, 4, 4$ $CD45.2^+GFP^-Cd11b^+Gr\text{-}1^+$, $n = 4, 4, 4, 3$ $GFP^-Ter\text{-}119^+$ for 10%, $n = 5$ for 25 and 50%, $n = 4, 4, 4, 4, 3, 4$ GFP^-CD41^+ and $n = 4$ for 75%, $n = 5$ and 2 for the last point for 100%; in **b**: $n = 3$ for 0%, $n = 4$ for 10%, $n = 4$ and 3 for the last point for 25%, $n = 5$ for 50%, 75%, and 100%, with *n* being individual mice and varying depending on time of sampling during the course of the experiment and on the group defined as the percentage of engrafted homozygous cells, as indicated in the Source data file). Significance to the 100% condition (black squares with connecting black solid line) was measured with nonparametric Kruskal–Wallis's multiple comparison test. In **a**, $*p = 0.0167$ (10%, GFP^-CD41^+), 0.0334 (25%, $CD45.2^+GFP^-Cd11b^+Gr\text{-}1^+$); $**p = 0.0023$ (10%, $CD45.2^+GFP^-Cd11b^+Gr\text{-}1^+$), 0.0094 (10%, $GFP^-Ter\text{-}119^+$) and in **b**, $*p = 0.0106$ (25%, GFP^-CD41^+); $**p = 0.0011$ (10%, GFP^-CD41^+), 0.0098 (25%, $CD45.2^+GFP^-Cd11b^+Gr\text{-}1^+$), 0.0015 (10%, $CD45.2^+GFP^-Cd11b^+Gr\text{-}1^+$), 0.0081 (10%, $GFP^-Ter\text{-}119^+$). **c** Percentages of homozygous *del52* and *ins5* cells ($CD45.2^+GFP^-$ cells) were assessed in HSC-enriched BM LSK and SLAM cells and are shown as means ± SEM, significance to the 100% condition with a two-sided parametric *t*-test: $*p = 0.0344$ (25% *del52/del52*, LSK), 0.0152 (*del52/del52* SLAM), 0.0132 (10%, *ins5/ins5* SLAM); $**p = 0.0143$ (25%, *ins5/ins5* LSK), 0.0028 (10%, *ins5/ins5* LSK). **d** The percentages of BM SLAM 4 months after tamoxifen induction of KI expression were determined and expressed according to the percentages of initially engrafted homozygous *del52* (colored squares and red solid line) and homozygous *ins5* (colored circles and green solid line) BM cells. For **c**, **d**, $n = 1$–5 independent mouse BM were analyzed, depending on the percentage of engrafted homozygous cells, as indicated in the Source data file. Source data are provided as a Source data file.

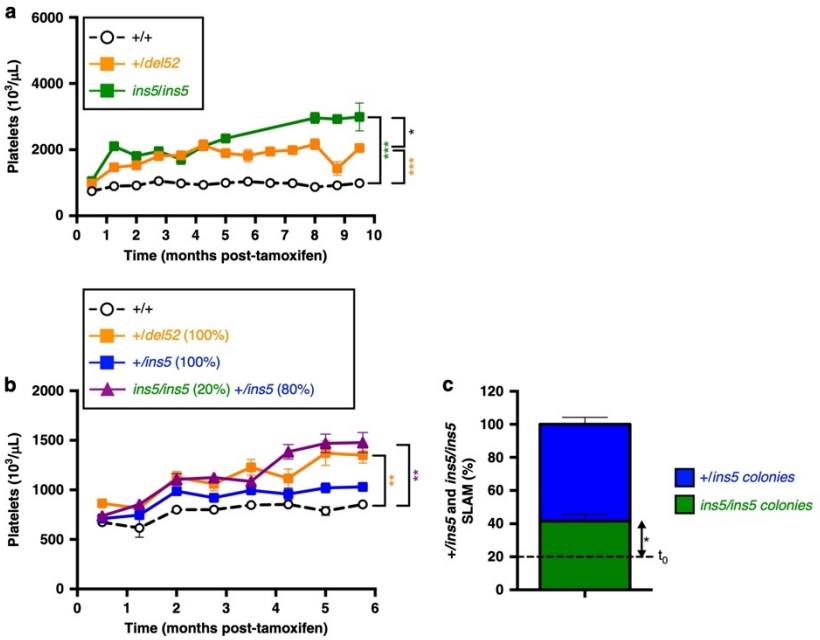


Fig. 8 Homozygous *ins5* cells drive the severity of the disease phenotype. a Comparison of the time-dependent increase in blood platelet levels of heterozygous *+/del52* (orange squares and solid line) and homozygous *ins5/ins5* (green squares and solid line) KI mice after tamoxifen induction. Means ± SEM ($n = 16, 18, 15, 11, 11, 8, 13, 7, 14, 11, 5, 6, 4$ *+/+*, $n = 18, 20, 15, 12, 10, 7, 11, 7, 12, 12, 8, 5, 10$ *+/del52* and $n = 6, 1, 6, 8, 9, 7, 5, 6, 5, 5$ *ins5/ins5* independent mice, as shown in the Source data file) and significance was determined using ANOVA with Tukey's multiple comparison test ($*p = 0.0365$; $***p < 0.001$). To investigate the effect of homozygous *ins5/ins5* cells in the development of thrombocytosis we engrafted 20% of *ins5/ins5* KI BM cells with 80% of heterozygous *+/ins5* KI BM cells in lethally irradiated mice (purple triangles with solid line). As controls we also engrafted 100% wt (*+/+*, open circles with black solid line), heterozygous *+/del52* orange squares with solid line) or *+/ins5* (blue squares with solid line) KI BM cells. Four weeks after transplantation, KI allele expression was induced by tamoxifen and **b** platelets were measured. Figure shows the means ± SEM ($n = 6$ *+/+* $n = 8, 8, 8, 8, 7, 8, 8, 8$ *+/del52*, $n = 8$ and 7 for the last point *+/ins5* and $n = 8, 8, 8, 8, 3, 8, 7, 7$ *ins5/ins5* and *+/ins5* mixed individual mice, as indicated in the Source data file). Significance was calculated with a nonparametric Kruskal–Wallis's multiple comparison test ($**p = 0.0076$ (*+/+* vs. 20% *ins5/ins5*), 0.0083 (*+/+* vs. 100%.*+/del52*). **c** At 6 months post-induction, single BM SLAM were sorted for a 10-day culture with all cytokines. Colonies were genotyped to retrospectively identify percentages of *ins5/ins5* (green) and *+/ins5* (blue) SLAMs. Data are the means ± SEM ($n = 3$ mice with an average of 58 genotyped colonies/mouse). Significance compared to the 20% of initially engrafted *ins5/ins5* BM cells (dashed line, t_0) was measured with a two-sided parametric *t*-test ($*p = 0.0492$). Source data are provided as a Source data file.

Homozygous *del52* and to a lesser extent homozygous *ins5* and heterozygous *del52* led to the amplification of the HSC compartment in BM and spleen. Competitive BM engraftment of homozygous *del52* and *ins5* cells confirmed that *del52* activity is more potent than *ins5* in promoting an advantage over the wt hematopoiesis, as previously shown in the RV model[8]. Indeed, an increase in the percentage of *ins5*-mutated cells was very slow when initial engraftment was below 50% of mutated BM cells, especially in the RBC and granulocyte compartments but also in platelets and in the BM HSC compartment. As mentioned earlier, it was observed that homozygous clones are more often identified in *ins5*-patients than in *del52*-patients, suggesting the importance of a gene-dosage for *ins5* oncogenic activity. In contrast, an absence of growth advantage of *del52* compared to *CALR wt* was observed using the *del52* TG BM cells in an initial 50% competitive transplantation[10]. Similarly, the effect of *del52* on HSC was absent when Li et al. performed a 50% homozygous *del52* BM cell competitive transplantation[13]. In these two studies, the heterozygous/homozygous *del52* expression was induced in donor mice before engraftment while we engrafted wt cells and induced homozygous del52 KI expression 1 month later. The only difference between the models of the group of AR Green and of our laboratory is the type of transgenic mice that were crossed with the floxed KI mice, Mx1-Cre (ubiquitous expression), and SCL-CreER^T (HSC and endothelial cell expression), respectively. Thus, our hypothesis is that either del52-expressing cells display a homing defect and/or that expression of del52 in the Mx1-Cre context is not sufficient to induce a competitive advantage. Alternatively, it is also possible that the amplification of HSCs observed in KI mice may correspond to an increase of a subpopulation of active HSCs with more proliferating capacities, that would result in milder secondary engraftment. Interestingly, the group of K Shimoda showed that CALR wt is able to inhibit the CALR del52-induced competitive advantage, thus it is possible that the total absence of CALR wt in homozygous *del52* or *ins5* HSCs might explain their advantage on their heterozygous counterparts[27]. With age, preferentially homozygous *del52* KI mice developed splenomegaly accompanied with a decrease in BM cellularity, while blood parameters remained constant. A decrease in BM cellularity was partially explained with the striking MK hyperplasia and increase in MK ploidy, as well as the decrease in the erythroid lineage while the granulocytic lineage remained constant. Splenomegaly was due to extramedullary hematopoiesis characterized with an increased frequency of giant MKs, erythroid, and granulocytic cells at the expense of the lymphoid cell populations. There was no global decrease in RBC since the decrease in BM was compensated by splenic erythropoiesis. Surprisingly, while the role of MKs in the development of MF has been largely documented[28], heterozygous *del52* KI mice, like human *del52* TG and murine *del19*, *del52*, and *del61* KI mice, did not develop or only minor fibrosis even in aged animals, although they present increased numbers of MKs in both BM and spleen. The homozygous *del52* KI mice, that presented an even higher MK hyperplasia in BM and spleen, showed minor fibrosis in BM and moderate fibrosis in the spleen. However, this difference in the grades of fibrosis severity seemed to be independent of different signaling (STAT5) intensities in BM *versus* spleen MKs. Conversely, moderate fibrosis in BM but not in the spleen was observed in the homozygous *del52* KI mice of Li et al. while MK hyperplasia was observed in both tissues[13]. Moreover, the progression of homozygous *ins5* KI mice to fibrosis was observed in rare cases with a lower grade compared to homozygous *del52* KI mice, maybe due to the highest amplification of MKs in the *del52* setting. These observations are coherent with the RV models where del52-compared to ins5-expressing mice develop high-grade fibrosis in both BM and spleen from 6 months post-BM transplantation[8]. We hypothesized that the differences of fibrosis in the RV compared to the KI models could be due to the activation of mu MPL by hu CALR mutants that were reported to be more efficient than the mouse/mouse combination[11,12]. As our KI mice express a murine CALR with a human mutated C-terminal tail chimeric protein, we tested to which extent they could activate mu MPL, compared to hu CALR del52 and ins5. The chimeric proteins were as efficient as hu CALR mutants to activate mu MPL, but chimeric protein and hu CALR were less active towards mu MPL than hu MPL. When MPL signaling in the homozygous *del52* KI mice was stimulated by the TPO agonist romiplostim, fibrosis was visible in both BM and spleen at slightly higher levels than wt-treated littermates. Thus, the suboptimal activation of MPL by the chim CALR del52 and chim CALR ins5 in our KI mice, that was confirmed by the over-activation of STAT5 by in vitro TPO stimulation of MK might partially explain the mild fibrosis phenotype. Of note, we did not detect any significant difference between CALR del52 and CALR ins5-induced activation of STAT5 in γ2A cell line. Whether this activation is also similar in vivo in HSCs or not and whether other signaling pathways may contribute to the distinct phenotypes developed by *del52* and *ins5* KI mice remain to be tested.

Overall, our KI mouse models show a differential effect of the two most frequent *del52* and *ins5 CALR* mutations in mouse hematopoiesis, in both a heterozygous and a homozygous setting. Therefore, these KI mice provide a powerful tool to better understand the differences between *del52* and *ins5 CALR* mutations and to perform preclinical studies. In addition, our observations suggest that homozygous *ins5* clone may play a more important role in the ET pathogenesis than previously thought, giving a future avenue of research in MPN pathogenesis.

Methods

Generation of conditional heterozygous and homozygous *CALR del52* and *CALR ins5* KI mice. *CALR del52* and *ins5* KI mice were generated at the Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France). The targeting vectors were derived from a genomic DNA fragment of murine *Calr* gene obtained from 129S2/SvPas mouse genomic DNA library. The intron 8 of the gene was modified to integrate firstly a cassette containing a fused exon 8$^-$exon 9 with the stop site and a triple polyA sequence surrounded with two LoxP sites, followed by a *Pgk-NeoR* cassette flanked by FRT sites and, secondly, a modified exon 9 with the 52-bp deletion (*del52*) or 5-bp insertion (*ins5*) mutation (untranslated). Due to the lack of homology between human and mouse in the alternative reading frame of the 3′UTR induced by the frameshift of the mutations, we chose an alternative strategy to express the putative *del52* and *ins5 Calr*-mutated murine genes by expressing a chimeric murine/human protein with most of the murine gene (except from the 52-bp deletion or 5-bp insertion in the last exon 9) and part of the 3′UTR human *CALR*, translated by the frameshift mutations. The human sequence was: AGGAT GATGAGGACAAAGATGAGGATGAGGAGGATGAGGAGGACAAGGAGGAA GATGAGGAGGAAGATGTCCCCGGCCAGGCCAAGGACGAGCTG**TAG**AGA GGCCTGCCTCCAGGGCTGGACTGAGGCC**TGA**, the human translated part after the mutated mouse CALR protein being: RRMMRTKMRMRRMRRTRRK MRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA.

The linearized homologous recombination vector constructs, including ≈4 kb 5′ and 3′ homology arms, were electroporated into C57BL/6N embryonic stem (ES) cells followed by G418 selection. Polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot were used to screen and identify homologously recombined ES cells that were injected into blastocysts and reimplanted into the uterine horns of pseudo-pregnant foster females to allow embryos to develop to term. Chimeras were crossed with C57BL/6N Tac mice carrying the *Flp* recombinase transgene in order to excise the *Pgk-NeoR* cassette[29]. Agouti color hair progenies were genotyped for germinal transmission of the targeted allele using PCR and Southern blotting analyses. Subsequently, these LoxP KI mice were transferred, bred, and studied in the animal facilities of Gustave Roussy. Cre recombination after crossing the LoxP KI mice with Cre-expressing transgenic mice (HSC-SCL-Cre-ER^T)[30] results in excision of the fused normal exons and expression of the genes with the mutated exon 9. Three-month-old Cre/LoxP KI mouse progenies were treated with tamoxifen (200 mg/kg daily dose, Sigma-Aldrich) for 4 consecutive days.

Mouse genotyping. Conditional *del52* KI mice were genotyped after genomic DNA extraction using the Mouse Direct PCR kit (Biotool) with a and b primers generating the wt (503 bp) and a conditional KI (404 bp) allele bands. The conditional *ins5* KI mice genotyping was similarly performed by PCR with the primers c and d amplifying the wt (217 bp) and the conditional KI (297 bp) alleles. The presence of the SCL-CreER^T copies was detected by PCR with p1, p2, p3, and p4 generating a 700 bp wt band (p1 and p2) and a 1,100 bp SCL-CreER^T band (p3 and

p4). Primer sequences are listed in Supplementary Table 1. Gel imaging was analyzed with Image Lab software (Bio Rad).

Analysis of mice. Animal experiments were conducted in Gustave Roussy animal facility and approved by Gustave Roussy review board, protocol no. 2016-104-7171. Mice were housed under 12-hour light/12-hour dark cycles and monitored ambient temperature (21 ± 1 °C) and humidity range (20–70%).

Blood, BM, and spleen. Platelet, hemoglobin, and WBC counts were determined using an automated counter (MS9; Schloessing Melet). BM cells were collected by flushing the femurs and tibias. Spleens were weighed and single-cell suspensions were prepared.

Content in progenitor and precursor cells by flow cytometry. Flow cytometry (LSRFortessa, FACSCanto X, BD Biosciences) with BD FACSDiva software was used to determine the cell content of BM and spleen with appropriate Abs. Lin^- cells were selected on the absence of labeling with APC-conjugated rat Abs against Ter-119, B220, Gr-1, CD3, and CD11b. $Lin^-Sca\text{-}1^+c\text{-}Kit^+$ (LSK) population was stained with Abs against Sca-1 (PE-Cy7) and c-Kit (PerCP-Cy5.5) and the $LSKCD48^-CD150^+$ (SLAM) population enriched in HSCs was isolated with anti-CD48 (Pacific Blue) and CD150 (BV510) Abs. Anti-CD41 (FITC) Ab was used to label MK progenitor (MkP) cells with the $LKSca\text{-}1^-CD150^+CD41^+$ combination. BM and spleen precursors were labeled as $CD41^+CD42^+$ (MK), $Cd11b^+Gr\text{-}1^+$ (granulocyte lineage), $CD3^+$ and $B220^+$ (T and B cells) and $Ter\text{-}119^+$ (erythroid cells). All Abs were obtained from BioLegend (Ozyme). Data were analyzed with Kaluza Analysis software (Beckman Coulter).

Analysis of WBC populations by flow cytometry. To investigate the cell population composition of WBCs (gating strategy in Supplementary Fig. 2a), we labeled blood using anti-Ly6G (APC-Cy7) Ab to identify polynuclear neutrophils ($Ly6G^+$). In the $Ly6G^-$ cell population we labeled B and T lymphocytes as $B220^+$ (BV510) and $CD3^+$ (PB), respectively. Among the $Ly6G^-B220^-CD3^-$ cells, NK cells were stained as $NKp46^+$ (FITC) while monocytes were stained as $CD11b^+$ (PE) $Ly6C^{-/+}$ (APC) in the $Ly6G^-B220^-CD3^-NKp46^-$ cell population. Gating on $Ly6G^-B220^-CD3^-NKp46^-$ $CD11b^-$cells we used anti-CD45 (PE-Texas Red) Ab and evaluated granularity with the sidewards scatter (SSC) parameter to distinguish eosinophils ($CD45^{high}SSC^{high}$) from basophils ($CD45^{low}SSC^{low}$). We further investigated different lymphocyte sub-populations (gating strategy in Supplementary Fig. 3a) in the $Ly6G^-$ cell population by combining Abs to detect T-cytotoxic lymphocytes as $CD3^+$ (Pacific Blue) $CD4^-$ (APC) $CD8^+$ (PE) and T-helper lymphocytes (TH) as $CD3^+CD4^+CD8^-$. In the TH gate, we used anti-FoxP3 (Alexa Fluor 488) and anti-CD25 (BV510) Abs to stain regulatory $CD4^+$ T cells (Tregs, $CD3^+CD4^+CD8^-FoxP3^+CD25^{+/-}$) and conventional $CD4^+$ T cells (TC, $CD3^+CD4^+CD8^-FoxP3^-CD25^-$). All Abs and the FoxP3 Fix/Perm buffer set were from BioLegend. Data were acquired with BD FACSDiva software and analyzed with Kaluza Analysis software (Beckman Coulter).

Progenitor assays in semi-solid cultures. Spleen and BM cells were plated in methylcellulose MethoCult 32/34 (Stemcell Technologies) with 10 ng/mL hu TPO (a generous gift from Kirin, Tokyo, Japan), 1 U/mL hu EPO (PreproTech), 10 ng/mL mu IL-3 (Miltenyi Biotec), 10 ng/mL hu IL-6 (Miltenyi Biotec) and 100 ng/mL mu SCF (PreproTech). After 7 days, colonies derived from erythroid (BFU-E, burst forming unit-erythroid) and granulo-monocytic (CFU-GM, colony forming unit-granulocyte macrophage) progenitors were counted. For megakaryocytic progenitor (CFU-MK) assay, BM nucleated cells were plated in duplicate in serum-free fibrin clot assays with 25 ng/mL mu SCF, 25 ng/mL hu IL-6 and without or with 20 ng/mL hu TPO. CFU-MKs were evaluated at day 7 by acetylcholinesterase staining.

Histology of BM and spleen. Tibia and spleen sections were fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified, and paraffin-embedded. Sections were stained with HES for cytology and MKs were immune-stained with rabbit anti-vWF Ab. Reticulin fibers were revealed by Gordon and Sweet's silver staining.

Romiplostim treatment. One month after tamoxifen induction of KI allele expression, homozygous *del52*/*del52* KI mice and wt (+/+) littermates were administered 1 mg/kg romiplostim (Nplate, Amgen) by subcutaneous injection on days 1, 8, and 15 based on a published study[15]. Platelets, WBC and hemoglobin were recorded on days 1 and 15. At day 20 mice were sacrificed to determine BM cellularity, spleen weight and the presence of reticulin fibers (Gordon and Sweet's silver staining) and MKs (vWF immunohistochemical staining) in BM and spleen.

Ploidy of BM MKs. BM cells were labeled with FITC-conjugated anti-CD41 and APC-conjugated anti-CD42 Abs (BioLegend). After hypotonic cell permeabilization with 0.1% sodium citrate, DNA content was stained with 50 µg/mL propidium iodide (Sigma) and treated with 50 µg/mL RNAase (Sigma). Ploidy was measured by flow cytometry in the $CD41^+CD42^+$ cell population by means of a LSRFortessa (Becton Dickinson) with a BD FACSDiva software. Data were analyzed with Kaluza Analysis software (Beckman Coulter). The mean ploidy was calculated in ≥8N MKs ((8N × number of cells at 8N ploidy level +…+64N × number of cells at 64N ploidy level)/total number of cells).

Western blot analysis. Lin^- cells isolated from BM were analyzed by western blot to determine the expression levels of CALR using a rabbit monoclonal Ab directed against the N-terminal portion of CALR (Cell Signaling, Ozyme), common to wt as well as mutant CALR. An Ab directed against amino acids 50–150 of human CALR from Abcam was also used, as well as a mouse monoclonal Ab specifically directed against the C-neoterminus of mutant CALR (Dianova). Mouse monoclonal anti-β-Actin (Sigma) served to monitor the loading. Blot was quantified using ImageJ software (National Institute of Health).

Dual luciferase transcriptional assay. The KI allele encodes the mouse CALR ins5 or del52 with human mutated C-terminal tail. These chimeric *CALR del52* and *CALR ins5* cDNAs were amplified by PCR from homozygous *del52* and *ins5* KI BM cells and introduced into a pMSCV-IRES-GFP vector. Transcriptional activation of STAT5 was analyzed in γ2A cells using the dual firefly reporter Spi-Luc and pRL-TK-driven renilla luciferase system (Promega). γ2A cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 reagent (ThermoFisher) with cDNAs coding for mu STAT5, mu JAK2 as the cells are defective in JAK2, hu CALR wt, hu CALR del52, hu CALR ins5, chim CALR del52 or chim CALR ins5 in the presence of mu MPL, hu MPL, or the empty pMX-IRES-GFP (PIG) vector, as indicated. Cells were stimulated or not with 25 ng/mL TPO (Miltenyi Biotec) for 24 h.

Phosphoflow assay. Lin^- cells isolated on ice from BM and spleen from ≥10 months post-tamoxifen *del52*/*del52* KI mice and from wt (+/+) littermates were stimulated or not with 100 ng/mL TPO for 15 min or incubated with 1 µM ruxolitinib (Selleck Chemicals, Euromedex) for 1 h at 37 °C, as indicated. Cells were fixed with 1.6% formaldehyde (ThermoFisher) and MKs were stained with Abs against CD41 (Alexa Fluor 700) and CD42d (APC) from BioLegend. After methanol permeabilization and staining for p-STAT5 (BV421, BD Biosciences), samples were analyzed by flow cytometry (LSRFortessa) with BD FACSDiva software. Data were analyzed with Kaluza Analysis software (Beckman Coulter).

Competitive transplantation models. All procedures were approved by the Gustave Roussy Ethics Committee (protocol 2016-104-7171). Lethally irradiated $CD45.1^+$ wt recipient mice (C57BL/6LY5.1, Charles River) were engrafted with 3.10^6 of different ratios (100%, 75%; %; 25%; 10 and 0%) of BM cells from $CD45.2^+$ floxed homozygous *del52* or *ins5* KI mice with transgenic $CD45.2^+$ wt mice expressing GFP (UBI-GFP/BL6)[31]. Four weeks after transplantation, KI allele expression was induced by tamoxifen. Blood parameters were followed every 3 weeks and the competitive advantage of the mutated *del52*/*del52* or *ins5*/*ins5* cells in the blood was monitored by flow cytometry as GFP^-CD41^+ in platelets, $GFP^-Ter\text{-}119^+$ in erythrocytes and as $CD45.2^+GFP^-Cd11b^+Gr\text{-}1^+$ in granulocytes. At 4 months after induction, the percentages of mutated cells were analyzed in LSK/SLAM compartments of both BM and spleen.

A competitive *ins5* KI transplantation model was made by engrafting 3.10^6 of a limited number of floxed homozygous *ins5*/*ins5* KI BM cells (20%) in presence of floxed heterozygous +/*ins5* KI cells (80%) into lethally irradiated wt recipient mice (C57BL/6JRj, Janvier Labs). As controls, 100% of floxed +/*ins5* KI, +/*del52* KI, and +/+ BM cells were also engrafted, as indicated. After 4 weeks, KI allele expression was induced by tamoxifen and blood parameters were analyzed every 3 weeks. At 6 months post-induction, SLAM cells were labeled from Lin^- cells isolated from BM and sorted (Influx, Becton Dickinson) at 1 cell per well in a 96-well plate. After 10 days of culture in a serum-free medium supplemented with 10 ng/mL hu TPO, 1 U/mL hu EPO, 20 ng/mL hu G-GSF (a generous gift from Gustave Roussy Hospital), 10 ng/mL mu IL-3, 10 ng/mL hu IL-6, 100 ng/mL mu SCF, and 100 ng/mL hu FLT-3L (Miltenyi Biotec), colonies were lysed to recover genomic DNA for PCR genotyping to retrospectively identify heterozygous and homozygous *ins5* KI SLAM (Supplementary Fig. 11). Primers used to detect the wt mouse *Calr* allele (302 bp) were muCALR_wt_ex8_F and muCALR_wt_onT2_R. Primers used to detect the *ins5* KI allele (177 bp) were muCALR_wt_int8-9_F and chimCALR_ins5_R. All primer sequences are listed in Supplementary Table 1.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the Prism software. If not otherwise mentioned, tests used an unpaired design. Comparisons were made using a parametric two-tailed *t*-test or a nonparametric Mann–Whitney test when needed, and ANOVA with Tukey's or Dunnett's multiple comparison tests or nonparametric Kruskal–Wallis multiple comparison test, as indicated. Differences were significative for $p < 0.05$.

Data availability

The authors declare that all relevant data supporting the findings of this study are included in the paper and its supplementary information files. Source data are provided with this paper.

Received: 15 November 2019; Accepted: 4 September 2020;
Published online: 28 September 2020

References

1. James, C. et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434**, 1144–1148 (2005).
2. Nangalia, J. et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2391–2405 (2013).
3. Klampfl, T. et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N. Engl. J. Med.* **369**, 2379–2390 (2013).
4. Pikman, Y. et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* **3**, e270 (2006).
5. Chachoua, I. et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* **127**, 1325–1335 (2016).
6. 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).
7. Cabagnols, X. et al. Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution. *Leukemia* **29**, 249–252 (2015).
8. Marty, C. et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* **127**, 1317–1324 (2016).
9. Toppaldoddi, K. R. et al. Rare type 1-like and type 2-like calreticulin mutants induce similar myeloproliferative neoplasms as prevalent type 1 and 2 mutants in mice. *Oncogene* **38**, 1651–1660 (2019).
10. Shide, K. et al. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia* **31**, 1136–1144 (2017).
11. Shide, K. et al. Mice with Calr mutations homologous to human CALR mutations only exhibit mild thrombocytosis. *Blood Cancer J.* **9**, 42 (2019).
12. Balligand, T. et al. Knock-in of murine Calr del52 induces essential thrombocythemia with slow-rising dominance in mice and reveals key role of Calr exon 9 in cardiac development. *Leukemia* **34**, 510–521 (2020).
13. Li, J. et al. Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage. *Blood* **131**, 649–661 (2018).
14. Balligand, T. et al. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. *Leukemia* **30**, 1775–1778 (2016).
15. Maekawa, T. et al. Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia* **31**, 2709–2716 (2017).
16. Tefferi, A. et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am. J. Hematol.* **89**, E121–E124 (2014).
17. Pietra, D. et al. Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* **30**, 431–438 (2016).
18. Stengel, A. et al. Detection and characterization of homozygosity of mutated CALR by copy neutral loss of heterozygosity in myeloproliferative neoplasms among cases with high CALR mutation loads or with progressive disease. *Haematologica* **104**, e187–e190 (2019).
19. El-Khoury, M. et al. Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* **39**, 5323–5337 (2020).
20. 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).
21. Kollmann, K. et al. A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation. *Leukemia* **31**, 934–944 (2017).
22. Theocharides, A. P. A. et al. Homozygous calreticulin mutations in patients with myelofibrosis lead to acquired myeloperoxidase deficiency. *Blood* **127**, 3253–3259 (2016).
23. Liu, P. et al. Immunosuppression by mutated calreticulin released from malignant cells. *Mol. Cell* **77**, 748–760.e9 (2020).
24. Arshad, N. & Cresswell, P. Tumor-associated calreticulin variants functionally compromise the peptide loading complex and impair its recruitment of MHC-I. *J. Biol. Chem.* **293**, 9555–9569 (2018).
25. Holmström, M. O. et al. The calreticulin (CALR) exon 9 mutations are promising targets for cancer immune therapy. *Leukemia* **32**, 429–437 (2018).
26. Cimen Bozkus, C. et al. Immune checkpoint blockade enhances shared neoantigen-induced T-cell immunity directed against mutated calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Discov.* **9**, 1192–1207 (2019).
27. Shide, K. et al. Calreticulin haploinsufficiency augments stem cell activity and is required for onset of myeloproliferative neoplasms. *Blood* **136**, 106–118 (2020).
28. Wagner-Ballon, O. et al. Monocyte/macrophage dysfunctions do not impair the promotion of myelofibrosis by high levels of thrombopoietin. *J. Immunol.* **176**, 6425–6433 (2006).
29. Birling, M.-C., Dierich, A., Jacquot, S., Hérault, Y. & Pavlovic, G. Highly-efficient, fluorescent, locus directed cre and FlpO deleter mice on a pure C57BL/6N genetic background. *Genesis* **50**, 482–489 (2012).
30. Göthert, J. R. et al. In vivo fate-tracing studies using the Scl stem cell enhancer: embryonic hematopoietic stem cells significantly contribute to adult hematopoiesis. *Blood* **105**, 2724–2732 (2005).
31. Schaefer, B. C., Schaefer, M. L., Kappler, J. W., Marrack, P. & Kedl, R. M. Observation of antigen-dependent CD8+ T-cell/ dendritic cell interactions in vivo. *Cell. Immunol.* **214**, 110–122 (2001).

Acknowledgements

This work was supported by grants from Ligue Nationale Contre le Cancer ("Equipe labellisée 2018", HR); Institut National du Cancer (PLBIO-2015, -2017 and -2018, IP), MPN Research Foundation (IP and JLV) and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm). The "Investissements d'avenir" program is funding the Labex GR-Ex (IP, WV). MCC was funded by São Paulo Research Foundation 2016/03265-3. We thank O. Bawa for histology, the staff of the animal facilities of Gustave Roussy and C. Catelain and Y. Lecluse at the Imaging and Cytometry Platform. We thank M-C. Birling and E. Geronimus at the Institut Clinique de la Souris (Illkirch) for the generation of KI mice.

Author contributions

C.M., I.P., and W.V. conceived and designed the study, interpreted the data and wrote the paper. C.M., C.B., and M.C.C. designed and performed experiments, analyzed the data and prepared the figures. A.N. performed and analyzed luciferase experiments and V.E. treated mice by romiplostim and analyzed data. D.M., L.T., and PG contributed to the bone marrow transplantation and mouse study and PR to flow cytometry experiments and analysis. S.N.C., H.R., and J.L.V. designed experiments analyzed the data and wrote the paper.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at https://doi.org/10.1038/s41467-020-18691-3.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.M.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at http://www.nature.com/reprints

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

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2020

Parties 2 et 3 : Étude de l'effet des *CALRmut* sur les CSH et mécanismes impliqués dans la différence de phénotype entre *CALRdel52* et *CALRins5*

Matériels et méthodes

Greffe compétitive pour comparer l'effet de l'induction du KI avant ou après la greffe

Afin de déterminer si l'expression du KI affecte l'avantage compétitif des CSH, comme rapporté par une équipe qui a utilisé un modèle KI semblable au notre (expression de la même chimère mais souris KI croisées avec les souris transgéniques Mx1-Cre au lieu de SCL-Cre), une greffe compétitive a été réalisée avec 40% de cellules de MO exprimant soit *CALRdel52* de façon hétérozygote ou homozygote issues d'une souris KI induite par le tamoxifène depuis 1 mois, soit CALRWT provenant d'une souris KI floxée non induite et 60% de cellules provenant d'une souris WT exprimant la GFP de façon ubiquitaire et constitutive (UBI-GFP). Au total, 3.10^6 de cellules de MO ont été greffées à des souris receveuses irradiées à dose létale. Dans le cas de la greffe avec des cellules CALRWT (souris KI floxée), l'expression du KI a été induite 1 mois après la greffe par gavage au tamoxifène.

Isolation des cellules progénitrices Lin- par tri magnétique

La totalité des cellules de la MO est incubée, à une concentration de 10^8 cellules/mL PBS 1X, avec des anticorps purifiés de rat dirigés contre les cellules hématopoïétiques matures de souris (Ter-119, B220, Gr-1, CD11b, CD4, Biolegend) pendant 30 min à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées pour éliminer l'excès d'anticorps et re-suspendues dans 1 mL de PBS puis incubées avec 10^8 cellules/mL billes magnétiques revêtues d'anticorps anti-rat (Dynabeads, Invitrogen) pendant 30 mins à 4°C sous agitation. Les cellules interagissant avec les billes (Lin^+) sont séparées des cellules libres (Lin^-) par un aimant.

Etude de la division des CSH avec le Violet Dye

Afin de mesurer l'effet de CALRdel52 et CALRins5 sur la prolifération des CSH, nous avons utilisé un colorant, le Cell Trace Violet Dye (ThermoFischer) qui diffuse passivement dans les cellules et marque de manière covalente les protéines intracellulaires. Ce colorant est ensuite hydrolysé par des estérases cellulaires et fluoresce. La dilution du signal fluorescent au cours du temps est proportionnelle au nombre de division cellulaire et est mesuré par cytométrie en flux. Une déplétion des cellules Lin^+ est réalisée suivie d'un marquage des CSH

au sein des Lin^- avec le panel d'anticorps Lin (Ter-119, B220, Gr-1, CD11b, CD4)-APC, c-Kit-PerCP-Cy5.5, Sca-1-PE-Cy7, CD48 APC-Cy7 et CD150-PE (Biolegend). Les cellules sont ensuite diluées dans une solution de 2 µM Cell Trace Violet Dye à une concentration de 5.10^6 cellules/mL pendant 20 min à 37°C. La réaction est neutralisée par ajout de 5 volumes de RPMI 10% de sérum de veau fœtal (SVF) à 37°C pendant 5 min. Les cellules sont lavées et les CSH ($Lin^-c\text{-}Kit^+Sca\text{-}1^+CD48^-CD150^+$)-Violet Dye^+ sont triées dans du milieu sans sérum (MSS) sur un trieur Influx (Becton Dickinson). Les CSH sont incubées à 37°C dans du MSS avec 100 ng/mL SCF murin ou sans pour les cellules analysées à J0. A 16 h post-tri, un point 0 (J0) est effectué afin de laisser le temps à l'excès de Violet Dye de dégorger des cellules. Le nombre de divisions cellulaires à 48 h post-J0 est analysé par cytométrie en flux (Fortessa, Becton Dickinson) et à l'aide du logiciel Modfit 5.0.

Cytométrie de masse (CyTOF)

Les os de souris sont récupérés sur glace dans du PBS 1X. Les cellules de MO sont ensuite isolées par centrifugation à 11 000 g pendant 1 min dans du PBS 1X avec 1/100 d'un cocktail d'inhibiteurs de phosphatase-2 (Sigma-Aldrich). Les cellules Lin^- sont isolées puis incubées dans une solution de cisplatine à 25 µM pendant 5 min qui marque les cellules mortes. Un lavage est réalisé dans 5 volumes de RPMI. Les cellules sont ensuite fixées par 1,6% de formaldéhyde puis resuspendues dans une solution de marquage Maxpar Cell Staining Buffer (Fluidigm) avec le panel d'anticorps de surface suivant :

ISOTOPE	ANTICORPS	CLONE
89 Y	CD45	30-F11
164 DY	Ly6A/E (Sca-1)	D7
173 YB	CD117 (cKit)	2B8
154 SM	CD48	HM48.1
167 ER	CD150	TC15
170 ER	CD34	RAM34
150 ND	CD135	A2F10.1
143 ND	CD41	MXReg30
168 ER	MPL	AMM2
151 EU	CD42d	1C2
166 ER	Ter119	Ter119
145 ND	CD3	17A2
144 ND	CD45R (B220)	RA3-6B2
174 YB	Ly6G/C (Gr-1)	RB6-8C5
148 ND	CD11b	M1/70
176 ND	calreticuline	EPR3924

Après 1 h à RT, les cellules sont lavées et perméabilisées avec du méthanol pur pendant 10 min sur glace pour être incubées avec le panel d'anticorps intracellulaires pendant 1 h à RT :

ISOTOPE	ANTICORPS	CLONE
147 SM	p-STAT5	clone 47
158 GD	p-STAT3	Y705
162 DY	STAT3	124H6
153 EU	p-STAT1	4A
152 SM	p-AKT	D9E
171 YB	p-ERK1/2	D13.14.4E
156 GD	p-p38	D3F9
175 LU	p-EiF2d	E90
142 ND	calreticuline	EPR3924
161 DY	JAK2	D2E12
172YB	KI-67	B56

Les cellules sont lavées et incubées 30 min à RT en présence de 100 nM d'iridium dilué dans une solution de 1,6% de formaldéhyde pour marquer l'ADN. Les cellules sont ensuite centifugées à 800 g, et conservées en culot sur la nuit dans la solution d'iridium. Le culot de cellules est lavé et remis en suspension dans la Maxpar Cell Acquisition Solution (Fluidigm) à une concentration de $0{,}5.10^6$ cellules/mL en présence de 10% de billes de calibration EQ™ Four Element Calibration Beads—100 mL (Fluidigm). L'acquisition est réalisée sur le cytomètre

de masse Helios en utilisant la réduction du bruit, les limites de longueur des événements étant de 10-150 poussées. Au moins 500 000 événements ont été acquis par échantillon à un débit de 0,03 mL/min. Les fichiers standard de cytométrie de masse ont été normalisés par rapport à une norme globale déterminée pour chaque log de billes EQ en utilisant le logiciel CyTOF v.6.7.1014 (Fluidigm).

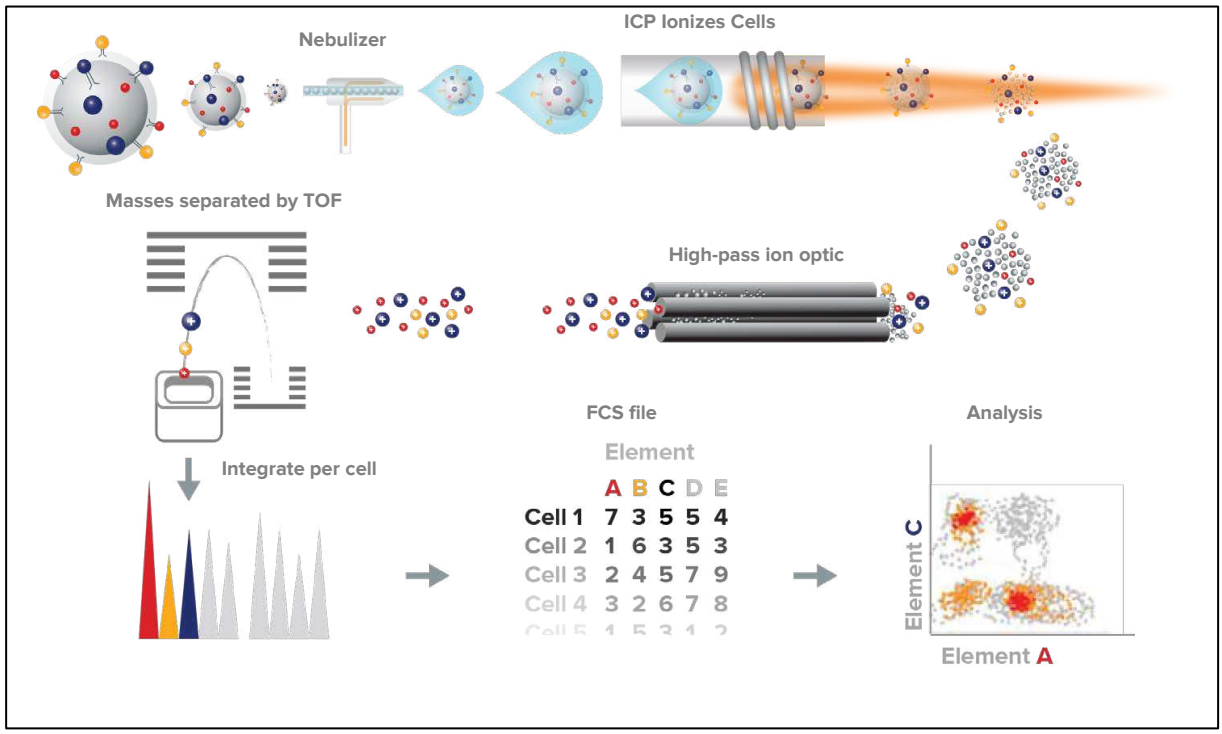


Figure 14 Fonctionnement de la technologie de cytométrie de masse par temps de vol (CyTOF). Les cellules marquées par des anticorps couplés à des métaux lourds passent, dans un premier temps, dans le nébuliseur où chaque cellule est intégrée dans une gouttelette. Chaque gouttelette passe dans un plasma d'Argon qui va désintégrer la cellule en nuage et ioniser les métaux lourds. Ce nuage passe ensuite dans un quadrupole qui retient atomes et ions de masse trop faible ou trop élevée et les ions restants sont séparés grâce au temps de vol défini par leur masse. On a donc une intensité pour chaque métal correspondant à un anticorps par nuage de cellule sous forme de fichier FCS.

Pour l'analyse des résultats, une collaboration a été réalisée avec Gurvan Hermange, étudiant en thèse dans le laboratoire du Pr. Paul-Henry Cournède à CentraleSupélec.

Nous avons dans un premier temps éliminé l'ensemble des contaminants possibles grâce au logiciel d'analyse Kaluza (Beckman Coulter). La stratégie de *gating* vise à éliminer les contaminants, sélectionner les cellules vivantes et sélectionner la population de cellules Lin^- (Figure 15).

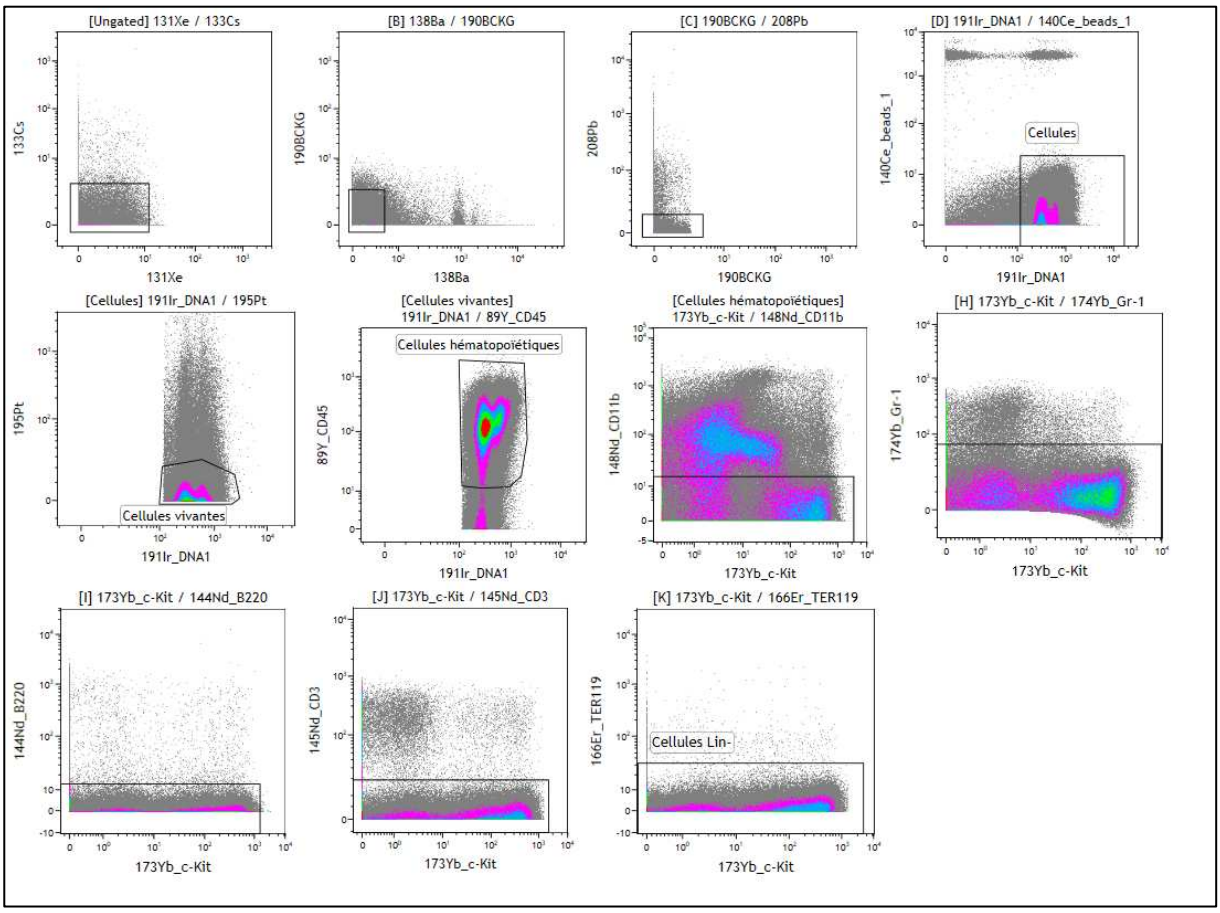


Figure 15 Stratégie de nettoyage des données brutes de CyTOF. Dans un premier temps les contaminants en métaux lourds sont exclus : Le césium (131Cs), le xénon (131Xe), le barium (138Ba), le plomb (208Pb), et le bruit de fond (190BCKG). Ensuite on sélectionne les cellules positives en ADN (191Ir_DNA) et négatives pour les marqueurs de billes de compensation (140Ce_beads). Les cellules positives pour la cisplatine (195Pt) sont les cellules mortes, la fraction négative est donc préservée. Les cellules d'intérêt sont les cellules hématopoïétiques $CD45^+$ (89Y_CD45), plus particulièrement les Lin-, on supprime donc toutes les cellules exprimant les marqueurs : Ter-119, B220, Gr-1, CD11b, CD3.

Par la suite nous avons établi les seuils d'intensité pour chaque marqueur utilisé. La méthode d'analyse est basée sur la construction d'un graphe des plus proches voisins à partir d'une projection UMAP des cellules Lin- préfiltrées puis par son exploration à partir de marches aléatoires d'une CSH à un MK. L'expérience de cytométrie de masse a été répétée 3 fois avec un trio de souris KI (WT, homozygote *CALRdel52* et homozygote *CALRins5*), il a donc été nécessaire de normaliser les données collectées lors de ces 3 jours distincts de manipulations. Pour cela, une correction des trajectoires de différenciation a été réalisée afin que l'expression de chaque marqueur se superpose pour les souris WT de chaque expérience. Par la suite, ces corrections ont été appliquées aux différentes souris *CALRdel52* et *CALRins5*. Pour la comparaison des trois groupes de souris ensemble, un test de Kruskall-Wallis a été réalisé.

Single cell RNA-seq

Des souris WT, homozygotes KI *CALRdel52* et KI *CALRins5* ont été sacrifiées à 6 mois post-induction de l'expression du KI et la MO a été récupérée. Une déplétion des cellules Lin^+ a été réalisée suivie d'un marquage des cellules LSK avec le panel : Lin (Ter-119, B220, Gr-1, CD11b, CD3)-APC, c-Kit-PE, Sca-1-PE-Cy7. La population LSK (cf. Figure 4) a été triée (Aria Fusion, Becton Dinckinson).

Les LSK ont été récupérées dans un milieu Hanks' Balanced Salt solution (HBSS ; Gibco) supplémenté avec 2% de SVF. Les cellules ont été lavées avec du HBSS et remises à la plateforme de Génomique de Gustave Roussy pour l'analyse scRNA-seq avec le kit Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kit v3.1 (Dual Index). Environ 15 000 cellules ont été analysées par souris. Les résultats ont été analysés par Quentin Blampey, étudiant en thèse dans le laboraoire du Pr. Cournède (CentraleSupélec) et Marine Aglave (plateforme bioinformatique de Gustave Roussy).

Greffe compétitive de CSH vWF^+ ou vWF^-

Afin d'étudier l'effet de *CALRdel52* sur les CSH ayant un biais mégacaryocytaire, nous avons croisé les souris KI *+/del52* – SCL-Cre avec des souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur du *vWF* (vWF-GFP, obtenues en collaboration avec S.W Jacobsen) afin de générer des souris KI *del52/del52* – SCL-Cre – vWF-GFP. Ces souris ont été sacrifiées et nous avons trié des cellules Lin^- – vWF^+ et Lin^- – vWF^-. Cette étape a été réalisée deux fois pour les cellules Lin^- – vWF^- afin d'éviter toute contamination par des cellules vWF^+ et biaiser les résultats. Nous avons greffé un nombre de Lin- et de cellules de MO compétitrice d'une souris WT CD45.1xCD45.2 correspondant à 150 CSH dans des souris receveuses irradiées à dose létale (9,5 Gy) (Figure 17). L'expression du KI a été induite par le tamoxifène 1 mois post-greffe générant 4 groupes d'étude : *+/+*-vWF^- ; *+/+*-vWF^+ ; *del52/del52*-vWF^- ; *del52/del52*-vWF^+. Les paramètres sanguins de ces souris ont été suivis (MS9) toutes les 3 semaines sur 6 mois ainsi que l'évolution du pourcentage de GFP dans les plaquettes (cellules exprimant le vWF) puis dans les CSH et progéniteurs au sacrifice.

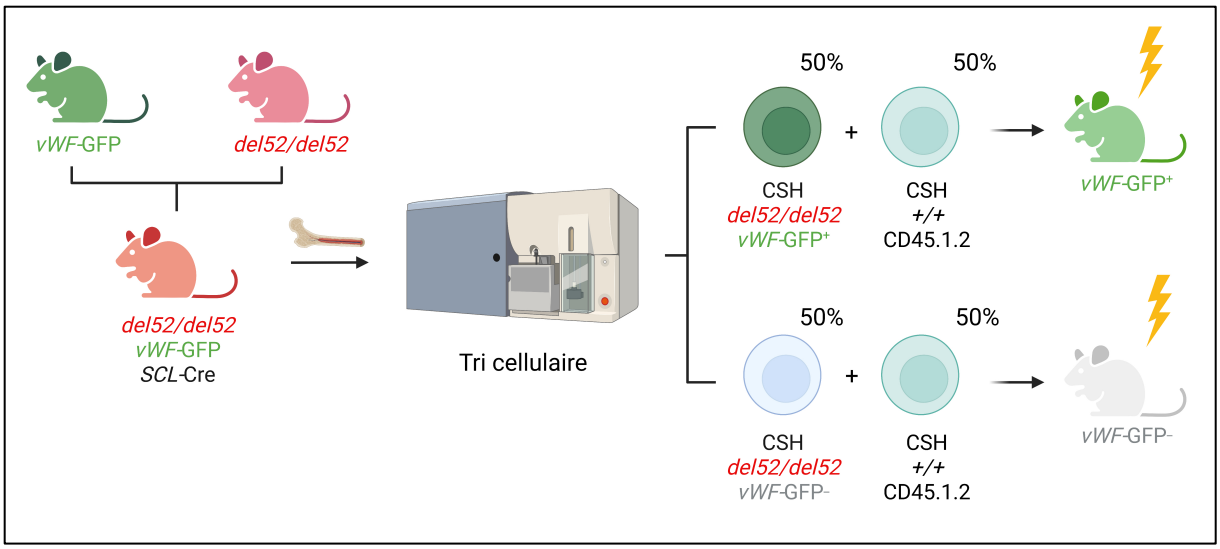


Figure 16 Stratégie de greffe compétitive des cellules vWF-GFP. Une souris transgénique vWF-GFP a été croisée avec une souris KI *del52/del52* – SCL-Cre afin de générer des souris KI *del52/del52* – SCL-Cre – vWF-GFP. La MO de ces souris a été isolée et les cellules triées par cytométrie en flux sur la base de leurs expressions en GFP. Des cellules Lin^- vWF-GFP^+ ou vWF-GFP^- provenant des souris KI del52/del52 – SCL-Cre – vWF-GFP et des cellules de MO de souris WT CD45.1.2, correspondant chacune à 150 CSH, ont été greffées dans des souris irradiées à dose létale.

I. Effet des mutations *CALRdel52* et *CALRins5* au niveau des CSH

1. Les CSH *CALRdel52* se divisent plus que les CSH *CALRins5* et WT

Lors de l'analyse de l'hématopoïèse des souris KI, nous avons observé une amplification du compartiment des CSH surtout pour les souris KI *del52/del52* ainsi qu'un avantage compétitif plus important et plus rapide de ces cellules par rapport à celles *ins5/ins5*. Nous avons donc décidé d'évaluer les capacités de division des CSH des souris *+/+*, KI *+/del52*, KI *del52/del52*, KI *+/ins5* et KI *ins5/ins5*. Pour cela, nous avons utilisé un colorant fluorescent, le Cell Trace Violet Dye, qui pénètre dans les cellules et qui se dilue au cours des divisions cellulaires, générant des pics de fluorescence observables par cytométrie en flux (Figure 17A). Les résultats montrent que les CSH *+/+* font majoritairement 2 divisions en 48 h, il en est de même pour les CSH *+/del52*, *+/ins5* et *ins5/ins5*. En revanche, les CSH *del52/del52* font majoritairement 3 divisions en 48 h (Figure 17B, C). L'index de prolifération (rapport du nombre total de divisions sur le nombre de cellules qui se sont divisées) révèle que les CSH *del52/del52* se divisent significativement plus que les CSH *ins5/ins5* et *+/+.*

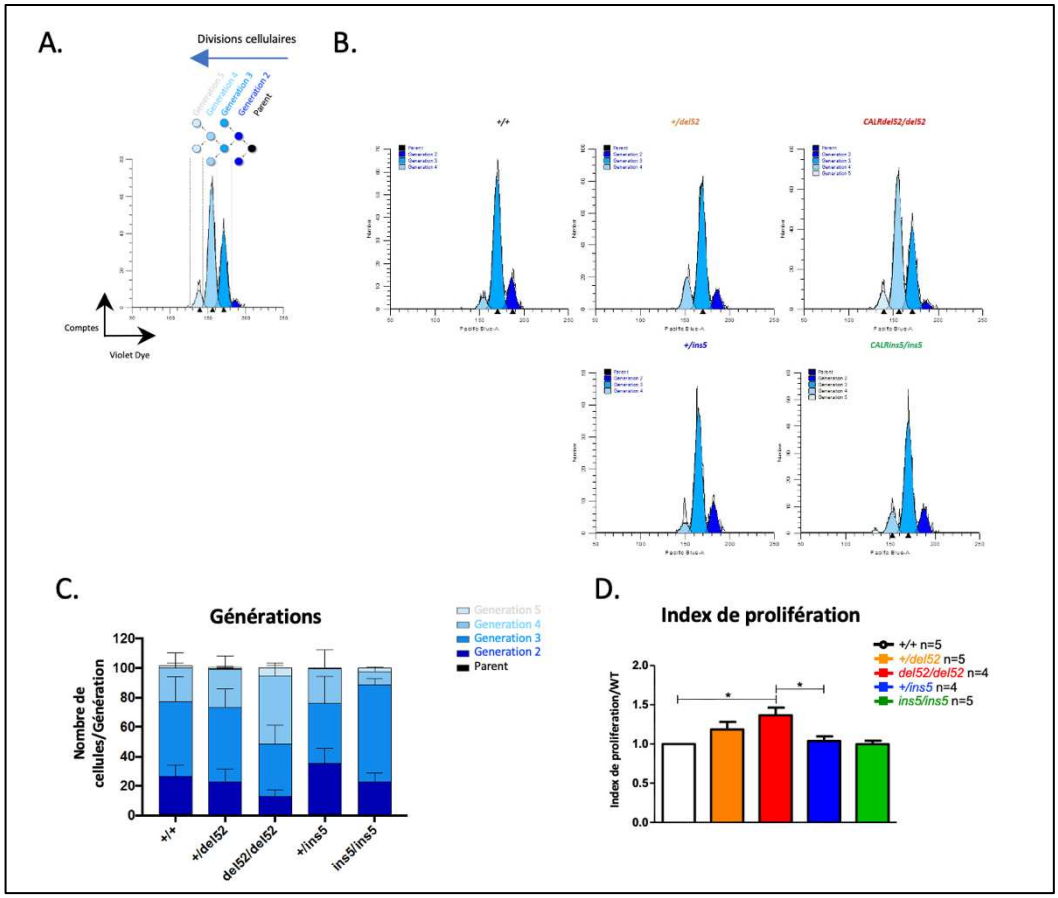


Figure 17 Étude de la division des CSH *CALRdel52* et *CALRins5*. A. Principe de fonctionnement du Violet Dye. Le colorant se dilue proportionnellement aux nombres de divisions de la cellule parent ce qui est mesuré par une diminution de l'intensité de fluorescence. B. Graphiques représentant les pics de division des CSH (SLAM) à 48 h post-J0. C. Graphique représentant la répartition du nombre de cellules par génération pour les souris *+/+*, *+/del52*, *del52/del52*, *+/ins5*, *ins5/ins5*. D. L'index de prolifération représentant le rapport du nombre total de divisions sur le nombre de cellules qui se sont divisées à 48 h post-J0.

2. Effet des *CALRmut* sur l'hétérogénéité des CSH

Chez la souris adulte (8 semaines), une grande partie (60%) des CSH expriment le vWF et sont considérées comme des CSH biaisées vers la lignée myéloïde/mégacaryocytaire (Sanjuan-Pla et al., 2013). Comme les *CALRmut* amplifient fortement la lignée mégacaryocytaire, nous avons cherché à comprendre l'effet de *CALRdel52* et *CALRins5* sur l'équilibre entre ces deux populations CSH-vWF$^+$ et CSH-vWF$^-$. Nous avons donc croisé nos souris KI *CALRdel52* avec des souris transgéniques exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur vWF. A partir des souris KI *del52* homozygotes générées, nous avons ensuite trié les cellules Lin$^-$ vWF$^+$ ou vWF$^-$ afin de greffer l'équivalent de 150 CSH en compétition avec de la MO WT CD45.1xCD45.2 correspondant à 150 CSH, puis avons suivi l'évolution des paramètres sanguins et des cellules portant la construction promoteur vWF-GFP après avoir induit l'expression de CALRdel52 par le tamoxifène dès la prise de greffe (1 mois post-transplantation).

La présence de CSH vWF$^+$, indépendamment de leur génotype WT ou *del52/del52*, entraine une augmentation des plaquettes chez les souris greffées plus élevée que chez celles greffées avec des cellules vWF$^-$ (Figure 18A). Cependant, nous avons pu constater que *CALRdel52* induit une thrombocytose, par rapport aux souris WT, que la mutation soit exprimée dans une CSH vWF$^+$ ou vWF$^-$, même si la thrombocytose est plus sévère en contexte vWF$^+$. Ces résultats indiquent que même dans un contexte vWF$^-$ qui définit, dans des conditions WT, des CSH avec un biais lymphoïde, l'accumulation de plaquettes est favorisée par *CALRdel52*. Ces observations sont confirmées avec l'étude du volume plaquettaire moyen (VPM) représentatif de la quantité de plaquettes dans le sang. Contrairement à nos attentes, nous n'avons pas observé de différence significative du nombre de leucocytes entre les différents groupes (attendu comme plus élevé en contexte vWF$^+$) mais un niveau global élevé pouvant éventuellement être lié aux conditions d'hébergement des souris.

L'analyse du pourcentage de cellules WT ou *del52/del52* greffées révèle une prise de l'avantage compétitif rapide pour les souris greffées *del52/del52* vWF$^+$ et *+/+* vWF$^+$ (dès 1

mois) mais aussi pour les cellules *del52/del52* vWF$^-$ dans les plaquettes et les neutrophiles qui constituent la lignée myéloïde. En comparaison, les souris greffées avec 50% de CSH *+/+* vWF$^-$ demeurent à 50% dans ce compartiment, sans prise d'avantage dans les plaquettes (Figure 18B). Par contre, ces CSH vWF$^-$ présente bien un biais lymphoïde important au niveau des lymphocytes B (avec 70% de cellules issues du greffon), ce qui est aussi le cas en présence de *CALRdel52*. Les CSH vWF$^+$ (WT ou *del52/del52*) conduisent de façon décalée à la production de lymphocytes B mais de façon ralentie en présence de *CALRdel52* suggérant que la mutation pourrait biaiser les CSH vWF$^+$ vers la lignée plaquettaire qui pourrait se traduire par un frein dans la génération des CSH vWF$^-$ en aval et de l'hématopoïèse qui en découle.

A 4 mois et demi post-induction, les souris ont été sacrifiées et la MO et la rate ont été analysées. Au niveau du compartiment des CSH, nous avons constaté la disparition des CSH *+/+* vWF$^-$ (CD45.1$^-$) au profit des CSH compétitrices (CD45.1$^+$), ce qui n'est pas le cas des CSH +/+ vWF$^+$ qui prennent l'avantage (Figure 18C). Nous observons que *CALRdel52* augmente la fréquence des CSH dans la MO principalement dans le contexte vWF$^+$ mais aussi vWF$^-$ et que dans les deux cas, la prise d'avantage est totale. Ces résultats suggèrent que les propriétés ST des CSH vWF$^-$ pourraient être modifiées par *CALRdel52* en LT-CSH.

La plupart des CSH vWF$^+$ greffées continuent d'exprimer le vWF et de façon intéressante, le groupe de souris greffées avec les CSH WT vWF$^-$ n'expriment toujours pas le vWF tandis qu'en présence de *CALRdel52*, 20 % des CSH sont devenues vWF$^+$ (Figure 18D).

L'analyse histopathologique montre la présence d'une fibrose dans la MO révélée par le marquage de la réticuline, en présence de *CALRdel52* par rapport à *+/+* principalement en condition vWF$^+$ et qui s'accompagne de l'augmentation du nombre et de la taille des MK (révélés par immunomarquage du vWF) plus importante (Figures 18C-E), confirmées par la mesure de la fréquence des MK (Figure 18F) et leur ploïdie moyenne (Figure 18G) par cytométrie en flux chez ces souris.

Ces résultats suggèrent que la maladie prendrait naissance principalement à partir d'une CSH vWF$^+$ et que *CALRdel52* pourrait biaiser une CSH vWF$^-$ vers la lignée mégacaryocytaire peut-être en modifiant les propriétés fonctionnelles de cette cellule. L'acquisition de la mutation au niveau d'une CSH vWF$^+$ semble entrainer leur amplification drastique (fréquence augmentée par 7 fois, comparée au groupe *del52/del52* vWF$^-$).

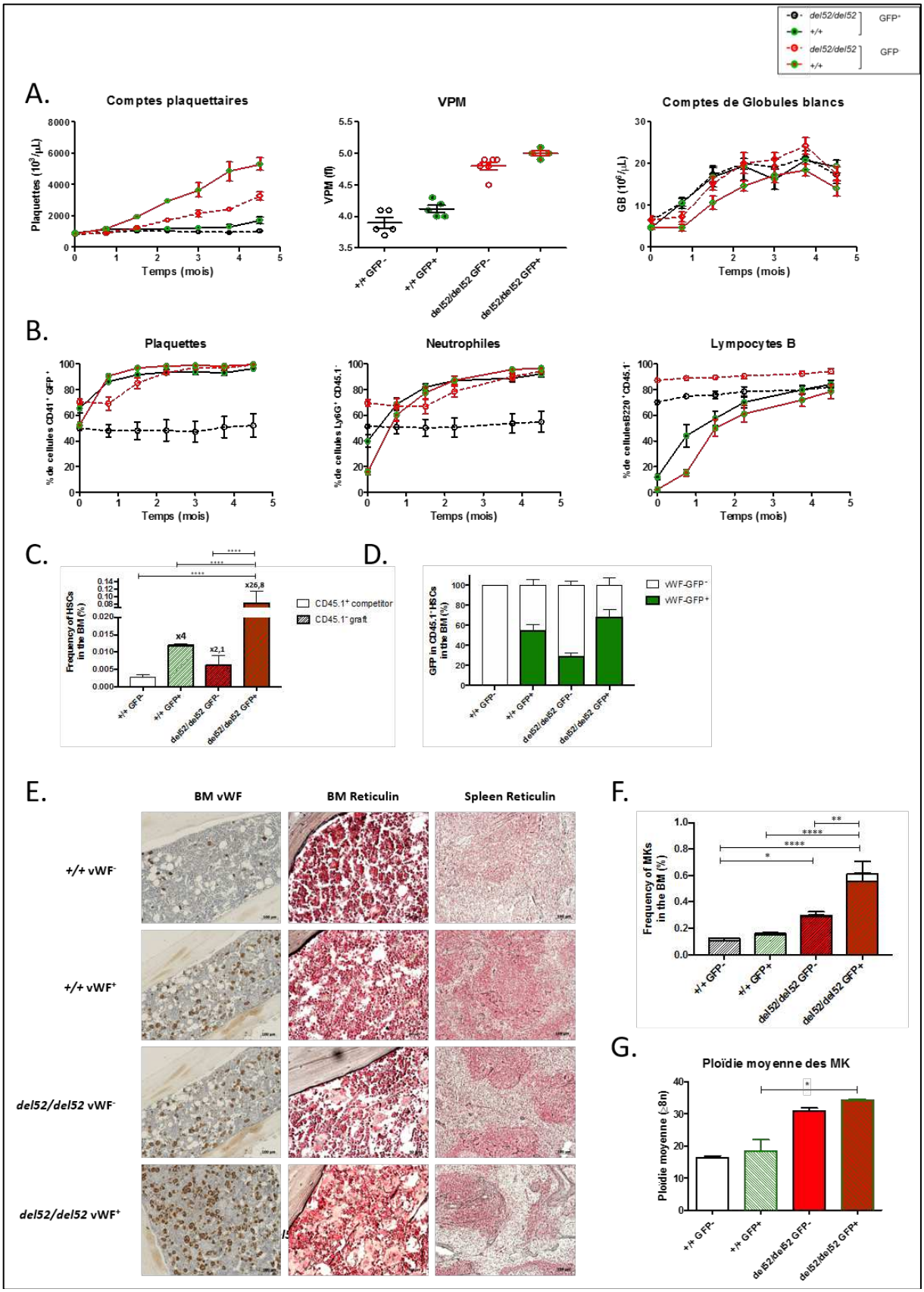


Figure 18 Rôle de CALRdel52 sur le biais mégacaryocytaire. A. Paramètres sanguins suivis toutes les 3 semaines sur 5 mois (n=5 pour les +/+ et n=7 pour les T1) sur un analyseur hématologique Mellet Schloessing 9 (MS9). B. Suivi des cellules mutées par cytométrie des populations de plaquettes (CD41+GFP+), granuleux (Mac1+Gr1+CD45.1-) et lymphocytes B (B220+ CD45.1-). C. Fréquence des CSH mutées (Lin-cKit+Sca-1+CD48-CD150+), les cellules mutées (CD45.1$^-$) sont représentées par la partie hachurée et les cellules provenant de la

compétitrice par la partie pleine (CD45.1^{+}). D. Pourcentage de cellules vWF dans les CSH. E. Analyse histopathologique de la MO et de la rate des souris à 5 mois post-greffe, le marquage du vWF révèle les MK et le marquage Gordon et Sweet révèle les fibres de réticuline. F. Analyse de la fréquence des MK par cytométrie en flux (CD41+CD42+). G. Analyse de la ploïdie moyenne des MK par cytométrie en flux

II. Étude des mécanismes impliqués dans la différence de phénotype entre *CALRdel52* et *CALRins5*.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans les différences phénotypiques induites par la *CALRdel52* et la *CALRins5*, nous avons réalisé des expériences de cytométrie de masse (Figure 19). Notamment, vous voulions savoir si la voie JAK2/STAT était activée de façon similaire ou non par CALRdel52 et CALRins5 dans les CSH et les MK et si d'autres voies pouvaient être différentiellement activées. Nous avons utilisé un panel d'anticorps permettant de caractériser les CSH et leurs progéniteurs ainsi que la lignée mégacaryocytaire. Dans un premier temps, les données brutes du cytomètre de masse ont été nettoyées et analysées afin de déterminer les seuils d'expression pour chacun des marqueurs. Par la suite, avec l'aide de Gurvan Hermange nous avons affecté chaque cellule à une population selon ses marqueurs d'expression pour générer des trajectoires de différenciation.

Tout d'abord, une analyse supervisée des niveaux de phosphorylation de STAT1, 3 et 5 dans les CSH des 4 souris de chaque génotype (*+/+*, *del52/de52* et *ins5/ins5*) n'a révélé aucune augmentation significative par CALRdel52 ou CALRIns5 de cette signalisation indiquant que dans ce compartiment cellulaire cette voie n'est peut-être pas la principale à être activée par les CALRmut (Figure 25, Annexes).

L'analyse des trajectoires de différenciation des marqueurs de surface (Figure 20A) montre une diminution de l'intensité d'expression des marqueurs Sca-1 et c-Kit au cours de la différenciation. Nous remarquons également une augmentation des niveaux des marqueurs caractéristiques des MK comme le CD41, CD42 et le CD150. De manière intéressante, nous pouvons observer des niveaux plus élevés d'expression pour les marqueurs CD41 et surtout CD42 dès la CSH en particulier pour *del52/del52* suggérant potentiellement un biais de ces cellules vers la lignée mégacaryocytaire.

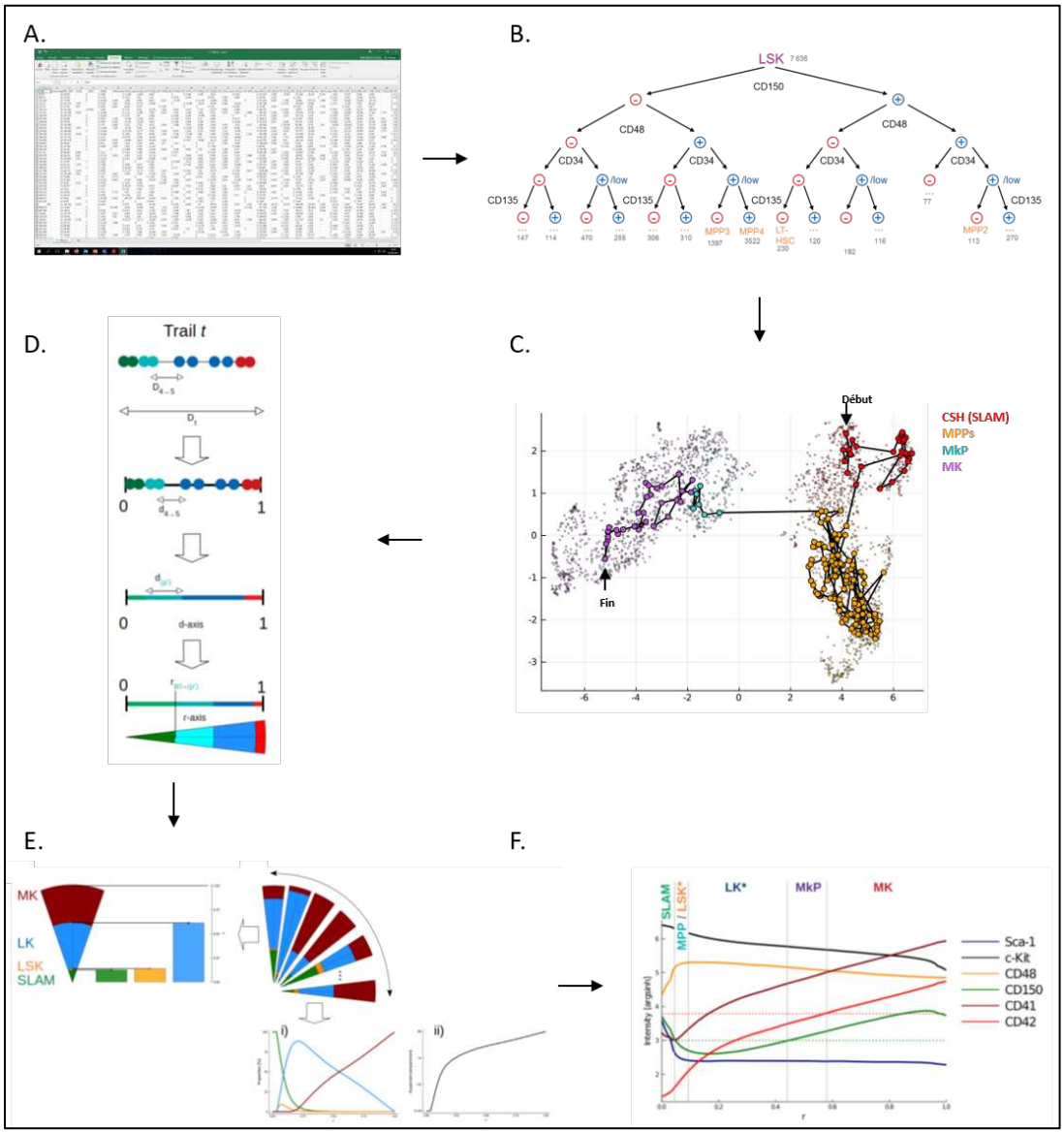


Figure 19 Méthode d'analyse des données de CyTOF. Les données brutes d'intensités de chaque marqueur par cellules (A) ont permis de les affecter aux populations déjà connues grâce à un arbre de décision (B). La projection UMAP des cellules en fonction des plus proches voisins (C) est explorée *n* fois de manière aléatoire en partant d'une CSH à MK ce qu'on appelle un trail. L'ensemble des trails sont normalisés et moyennés afin de voir le comportement moyen pour chaque souris (D). La répartition des différentes populations à partir des trails permet de construire une trajectoire de différenciation ou *r* est l'axe de progression (E) ce qui rend possible la visualisation de l'évolution des marqueurs au cours de la différenciation (F).

L'étude des marqueurs nous a confirmé une diminution des niveaux intracellulaires de CALR dans les conditions *CALRmut* ainsi qu'une augmentation de l'expression de p-eiF2α révélant un stress du RE différentiel dans les CSH *CALRdel52* par rapport aux cellules *CALRins5*, et qui s'atténue au cours de la différenciation MK (Figure 20B). En parallèle, nous remarquons une expression plus élevée des CALRmut à la surface des cellules, confirmant leur adressage/sécrétion à la membrane. Nous avons également constaté des niveaux plus faibles

de MPL à la surface des cellules qui pourraient illustrer une down-régulation de la signalisation constitutive. De plus, nous avons trouvé des niveaux plus élevés des marqueurs de signalisation, p-AKT et p-ERK1/2 dans les cellules *CALRdel52* tout au long de la trajectoire de différentiation. On note également une augmentation de l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 dans les CSH *CALRdel52* à la limite de la significativité. Les résultats montrent que les cellules *CALRdel52* possèdent des niveaux de signalisation plus élevés que les cellules *CALRins5* et WT dans les CSH et dans la lignée MK.

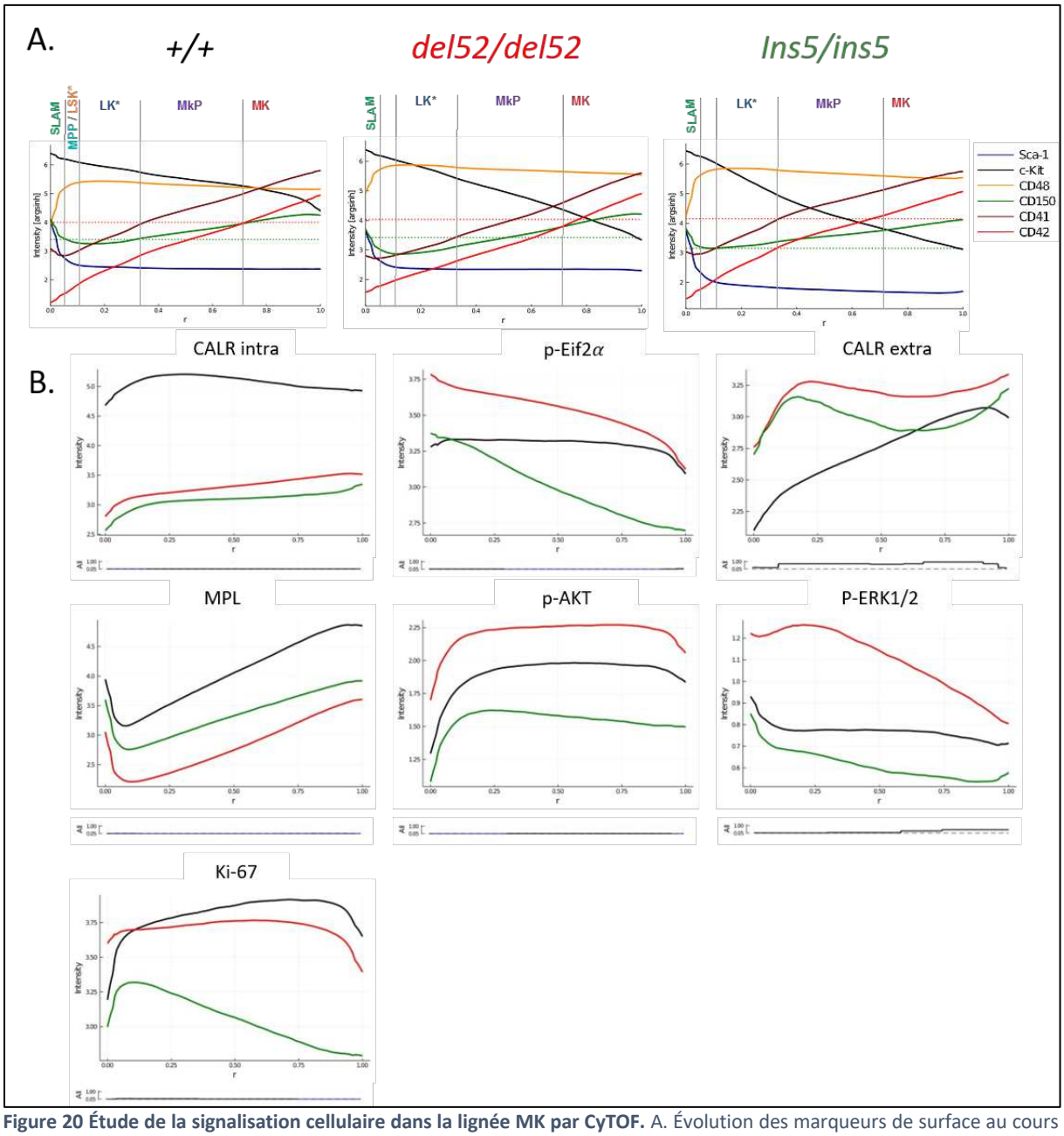


Figure 20 Étude de la signalisation cellulaire dans la lignée MK par CyTOF. A. Évolution des marqueurs de surface au cours de la trajectoire de différenciation mégacaryocytaire. B. Comparaison des niveaux d'expression des marqueurs intracellulaires au cours de la trajectoire de différenciation. Des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés (bleu = p.value < 0,05).

Pour approfondir notre étude des mécanismes expliquant les phénotypes de ces souris, nous avons réalisé des expériences de scRNA-seq sur des LSK de souris *+/+*, KI *del52/del52* et *ins5/ins5.* L'analyse mathématique par Quentin Blampey a permis d'organiser les cellules en clusters grâce à des listes de gènes connues pour chaque population des CSH aux MPP1-5 (Figure 21A). Dans un premier temps, nous remarquons que les profils des souris *+/+* et *ins5/ins5* se ressemblent alors que celui de la *del52/del52* se démarque. En effet, nous notons une augmentation de la proportion de CSH ainsi que la diminution de progéniteurs MPP4 chez cette souris. Concomitamment, aux résultats de la greffe vWF, nous observons que l'expression du vWF est augmentée dans les CSH *del52/del52* et de manière intéressante nous notons que ce n'est pas le cas dans le cas des CSH *ins5/ins5* (Figure 21B).

Par ailleurs, nous notons que le nombre de gènes différentiellement exprimés dans les CSH est bien supérieur dans les *CALRdel52* par rapport aux *CALRins5* (Figure 22A). Les gènes différentiellement exprimés spécifiques de *CALRde52* obtenus à partir du diagramme de Venn font principalement partie des voies du cycle cellulaire (et de l'inflammation) tandis qu'ils affectent plutôt les voies de la glycolyse et du chimiotactisme pour les *CALRins5* (Figure 22B). Lorsque l'on s'intéresse aux voies affectées communes aux deux *CALRmut* les distinguant des WT, on remarque qu'elles incluent le cycle cellulaire, la régulation de transcription, l'immunité et la réponse au stress. Parmi les gènes dérégulés dans la signature de réponse au stress, nous retrouvons plusieurs gènes codant pour des protéines chaperonnes et autres protéines impliquées dans des voies de l'UPR (Figure 22C). De façon générale, les *volcano-plots* générés pour la réponse au stress de l'analyse scRNASeq montre que l'amplitude des dé-régulations des gènes compris dans cette signature est plus importante avec *CALRdel52* qu'avec *CALRins5*. Deux gènes candidats nous paraissent particulièrement intéressants : le *Mesencephalic Astrocyte Derived Neurotrophic Factor* (*Manf*) qui code pour une protéine du RE/Golgi qui peut être secrétée et qui impliquée dans la prise en charge du stress du RE (Xu et al., 2019) et le gène codant pour la protéine S100A6 impliquée dans la régulation des CSH (Grahn et al., 2020) (Figure 22D, E).

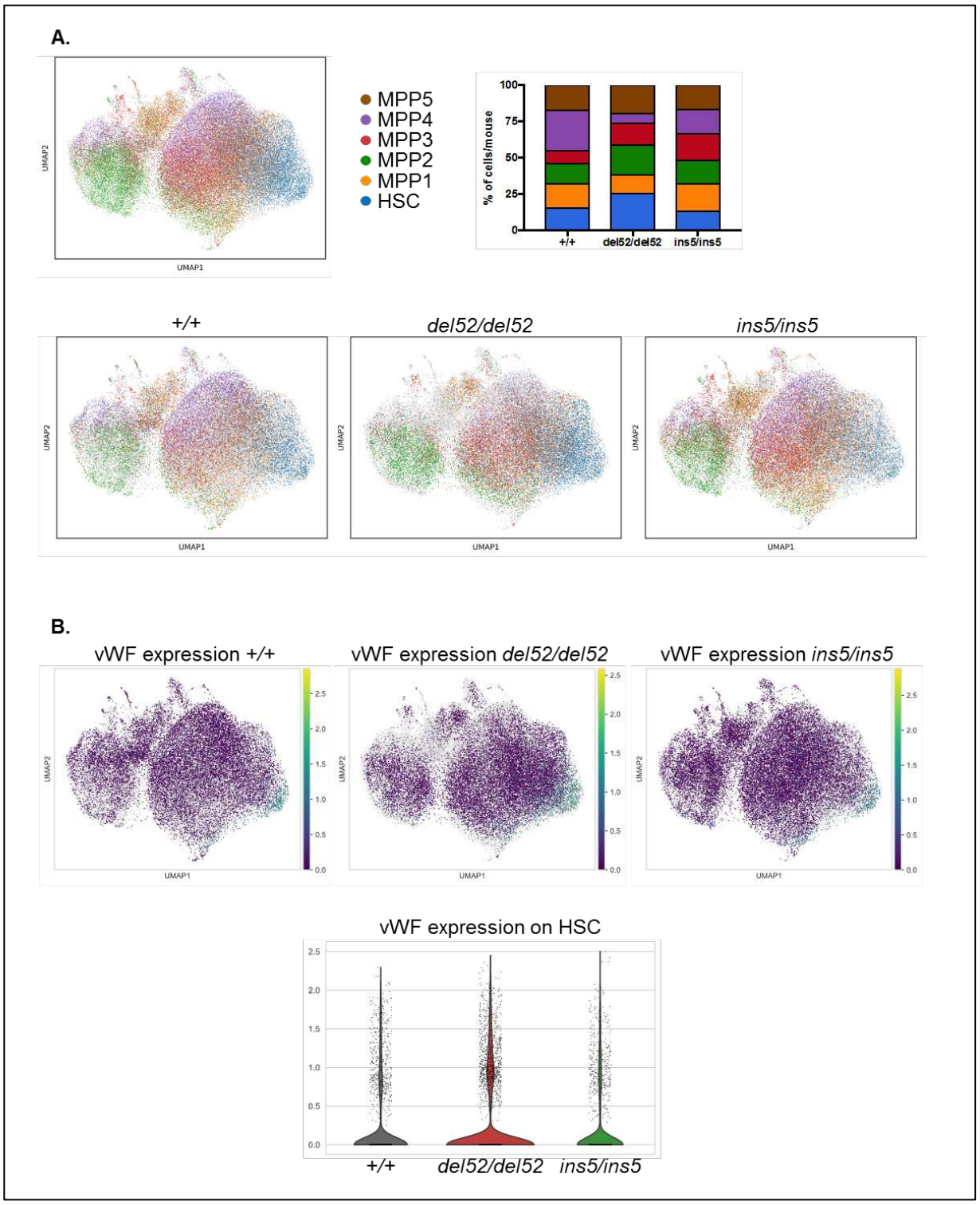


Figure 21 Etude de l'impact des *CALRmut* sur le compartiment des progéniteurs et CSH par scRNA-seq. A. Projection UMAP des cellules LSK *+/+, del52/del52* et *ins5/ins5* superposées (graphe haut-gauche) et séparés (graphes bas) et histogramme représentant la répartition des différentes populations de cellules par génotype. B. Niveau d'expression du vWF dans les LSK de souris (haut) et *violin plot* montrant le niveau d'expression du vWF dans les CSH.

L'analyse GSEA du RNAseq en bulk sur des CSH (SLAM) a montré 28 signatures de gènes différentiellement exprimés entre les SLAM *del52/del52* et *ins5/ins5* (Figure 27, Annexes).

Parmi ces signatures, nous avons retrouvé la voie de l'UPR rappelant l'activation différentielle de eiF2a par CALRdel52 dans les CSH en CYTOF. On note que la voie PI3K/AKT (mise en évidence par le CYTOF), les cibles de E2F et de la production des ROS parmi plusieurs autres signatures sont dérégulées dans les SLAM *CALRdel52* par rapport aux *CALRins5*.

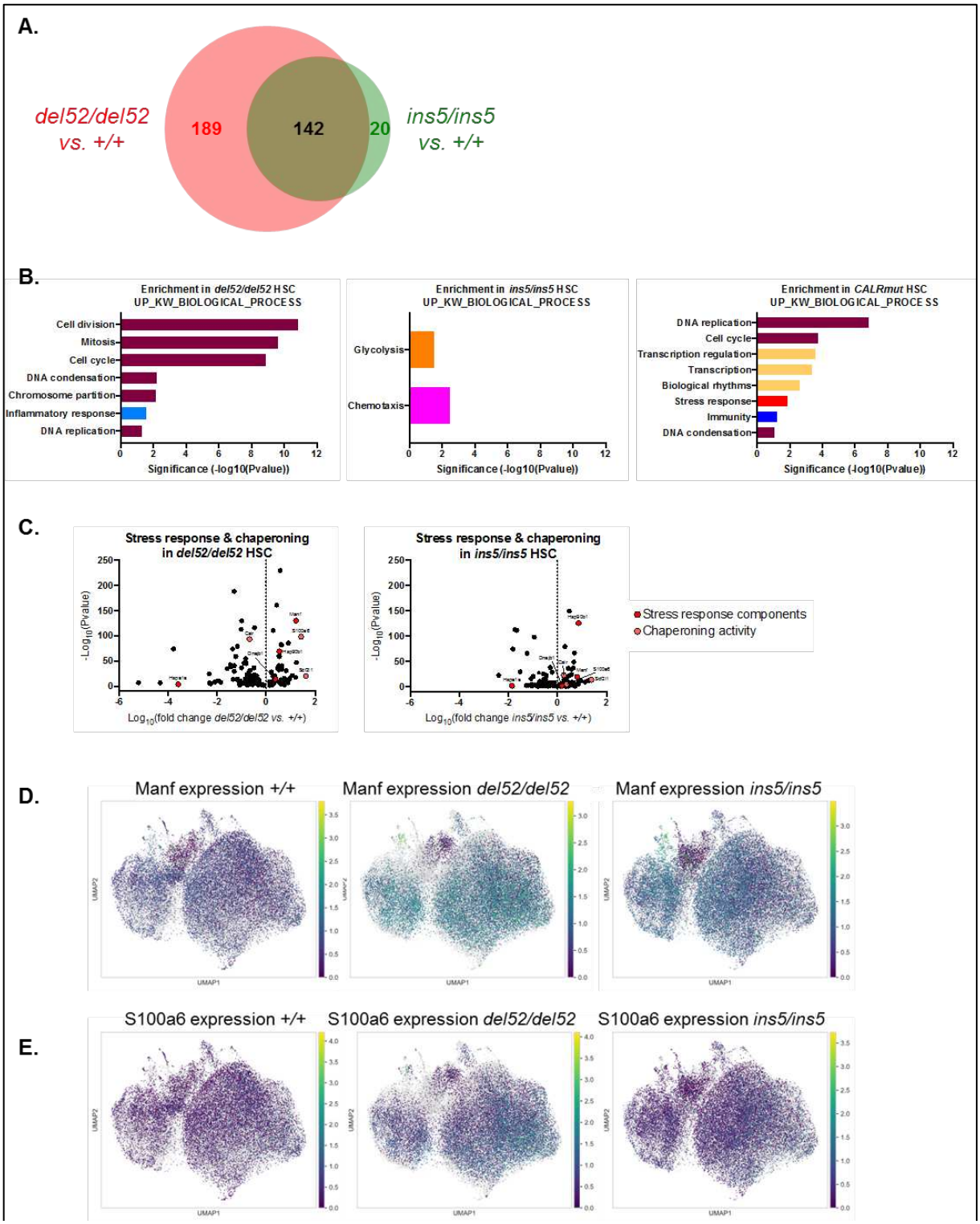


Figure 22 Effet des *CALRmut* sur le stress du RE. A. Diagramme de Venn représentant les gènes dérégulés entre les souris KI et les souris +/+ contrôles. B. Principales signatures enrichies chez les souris KI *CALRdel52* vs. *+/+* (gauche), *CALRins5* vs. *+/+* (milieu) et *CALRmut* vs. *+/+* (droite). C. Volcano plot représentant les gènes dérégulés dans la signature de la réponse au stress des souris KI *CALRdel52* vs. *+/+* (gauche) et *CALRins5* vs. *+/+* (droite). D. Niveau d'expression du gène *Manf* sur projection UMAP. E. Niveau d'expression du gène *S100a6*.

Discussion

L'objectif de ce travail s'est scindé en deux temps : 1) comprendre et caractériser l'impact des deux types de *CALRmut* sur l'hématopoïèse des souris KI et 2) identifier les mécanismes au niveau des CSH expliquant les différences phénotypiques observées, induites par les mutants CALRdel52 et CALRins5.

Développement et progression de la maladie chez les souris KI

La première partie de mon travail s'est concentrée sur le suivi du développement de la maladie et la caractérisation de l'effet des deux types de *CALRmut* sur l'hématopoïèse de ces souris KI. Nous avons été la première équipe à comparer l'effet de l'expression physiopathologique de *CALRdel52* et *CALRins5* sur l'hématopoïèse.

Chez la souris KI, la mutation *CALRdel52* induit un phénotype plus sévère que *CALRins5* avec le développement d'une thrombocytose progressant de façon plus pénétrante vers une fibrose. Les phénotypes induits par *CALRdel52* et *CALRins5* sont amplifiés en contexte homozygote. Plusieurs autres modèles de NMP *CALRmut* ont été générés, exprimant principalement *CALRdel52* (humaine ou son homologue murine) et des *type 1-like*. Les modèles rétroviraux (RV) de souris générés par notre équipe et exprimant les formes humaines des deux types de *CALRmut* ou des mutants plus rares de type 1- et type 2-*like* développent une TE progressant vers une fibrose de grade 3-4 dans la MO et la rate dès 6 mois après la transplantation dans le cas de *CALRdel52* et des mutants de *type 1-like* (Marty et al., 2016b, Toppaldoddi et al.). Le développement de cette MF sévère dans le modèle RV a été confirmé par Nguyen *et al.* (Nguyen, Morse, et Fleischman, 2016) mais n'a pas été reproduit par Elf *et al.* dont les souris RV *CALRdel52*, qui ont été étudiées sur 4 mois, développent une TE modérée sans progression vers la MF, reflétant probablement des niveaux d'expression plus faible du mutant que dans les autres modèles RV (Elf et al., 2016). De façon similaire, les souris transgéniques exprimant la forme *CALRdel52* humaine, suivies sur 6 mois, ne développent qu'une faible TE, ce qui suggère que dans ce modèle les niveaux d'expression du mutant doivent être beaucoup plus bas que dans les modèles RV décrits plus hauts (Shide et al., 2017). Les modèles KI constitutifs générés par la suite à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 exprimant de façon hétérozygote (l'homozygotie est létale au stade embryonnaire comme le KO *Calr*) des mutants murins de type 1 (*CALRdel52* et *CALRdel19*)

présentent un phénotype de faible TE (Balligand et al., 2020 ; Shide et al., 2019). Nos souris KI conditionnelles exprimant une forme chimère souris-avec la queue C-terminale mutante humaine sont très similaires au modèle de souris KI *CALRdel52* développé par Li *et al*. (Li et al., 2018). La construction utilisée pour la génération de ces 2 modèles est différente mais aboutit à l'expression d'exactement la même chimère après croisement avec des souris transgéniques qui sont soit SCL-CreER^T soit Mx1-Cre puis induction. Ces souris KI *CALRdel52* développent une TE qui évolue vers une fibrose dans la MO ou dans la rate, surtout en contexte homozygote. Dans ces souris KI conditionnelles aussi, la quantité de CALRmut semble déterminer la sévérité du phénotype. En effet, les souris KI *CALRdel52* hétérozygotes ont une faible TE qui progresse peu, comme les souris transgénique et KI constitutives.

En comparaison, les patients *CALRdel52* sont principalement hétérozygotes et majoritairement représentés dans les MF (Cabagnols et al., 2015). Nous avons montré que l'intensité du phénotype incluant la thrombocytose et progression en MF pourrait être liée au niveau d'activation de la signalisation MPL. En effet, à l'aide d'essais luciférase nous avons constaté que contrairement au MPL humain, la forme murine de MPL n'est pas aussi efficacement activée par les CALRmut humains et chimères. Dans le modèle RV cette interaction/activation peu efficace entre MPL murin/CALRmut humain semble être « compensée » par des niveaux élevés d'expression du CALRmut dus à la nature même du modèle (intégration aléatoire et multiple du rétrovirus).

Nous avons observé que les souris KI *CALRdel52* présentaient une thrombocytose plus sévère que les souris *CALRins5* alors que c'est l'inverse chez les patients (Pietra et al., 2016 ; Tefferi et al., 2014). Comme mentionné dans l'article, plusieurs hypothèses sont possibles. Cette apparente contradiction pourrait s'expliquer par la possibilité que CALRdel52 et CALRins5 n'activent peut-être pas de la même façon le MPL humain et le MPL murin. Une autre hypothèse pourrait être que certaines TE *CALRdel52* sont en réalité des pré-fibroses mal diagnostiquées avec des comptes plaquettaires déjà en chute, ce qui fausserait la moyenne des comptes plaquettaires pour le groupe TE *CALRdel52*. Cela concorde avec la plus forte prépondérance des patients *CALRdel52* à évoluer en MF comparativement à ceux *CALRins5* (Cabagnols et al., 2015). En somme, si on prend en compte l'ensemble des patients portant des *CALRmut*, et la proportion de ceux qui développent une fibrose, on peut imaginer que la pénétrance de la fibrose est relativement faible, ce que nos souris représentent bien.

Enfin, si la faible fibrose développée par les souris KI *CALRdel52,* notamment dans les souris KI homozygotes exprimant 2 fois plus de CALRmut que les souris hétérozygotes, peut-être en partie expliquée une faible induction de la signalisation oncogénique par MPL comme discuté plus haut, on peut également supposer que l'absence de la CALRWT (dans le contexte KI homozygote) pourrait nuire à la maturation dans le RE de facteurs pro-fibrosants comme le TGF-β. Il serait donc intéressant de vérifier cette hypothèse en réalisant par exemple un *cytokine array* permettant de quantifier les niveaux des cytokines pro-fibrosantes dans la MO de nos souris KI.

Amplification des CSH chez les souris *CALRdel52* et *CALRins5*

Les *CALRmut* induisent une expansion du compartiment des CSH auxquelles elles confèrent un avantage compétitif sur l'hématopoïèse WT, plus important et plus rapide avec *CALRdel52* comparé à *CALRins5*. L'ensemble de ces changements est accentué en contexte homozygote ce qui suggère une importance du clone homozygote dans les NMP humains. De plus, nous avons montré que les CSH *CALRdel52* se divisent plus que les CSH *CALRins*5 et WT et ont un cycle cellulaire plus actif. Nos expériences évaluant la division cellulaire mériteraient cependant d'être reproduites en utilisant un marquage des CSH afin de voir si les CSH qui se divisent se différencient ou s'auto-renouvèlent *in vitro*.

Nous avons observé un avantage compétitif des cellules mutées *CALRdel52* mais aussi *CALRins5*. En effet, à 4 mois post induction toutes les CSH étaient mutées mais seul le compartiment des CSH des souris CALRdel52 était amplifié. Ces résultats sont discordants de ceux de l'équipe de Tony Green qui n'a pas rapporté d'avantage compétitif des cellules *CALRdel52* (Li et al., 2018). Nous avons souhaité vérifier si une différence dans la stratégie de greffe (induction du KI après la greffe dans notre cas ou avant dans son cas) pouvait expliquer ce résultat, peut être lié à un éventuel défaut de retour à la niche des CSH mutées *CALRdel52*. Nous avons donc réalisé des greffes compétitives à 40% de cellules induites avant ou après la transplantation (cf. Figure 24, Annexes). Dans ces deux cas, les cellules *CALRdel52* ont pris l'avantage suggérant un possible problème dans la stratégie ou l'analyse des résultats de l'équipe de Tony Green. Leur greffe de cellules de souris KI *CALRdel52* CD45.2 en compétition avec des cellules de souris WT CD45.1xCD45.2 dans des souris irradiées CD45.1 ne leur a pas permis de suivre l'évolution du chimérisme dans les plaquettes et les érythrocytes dans le sang contrairement à notre stratégie utilisant des cellules de MO de souris WT UBI-GFP

(expression ubiquitaire de la GFP). Par ailleurs, Li *et al*. n'ont pas vérifié le pourcentage de cellules mutées à t0, détectent environ 100% de cellules mutées dans le compartiment myéloïde à 4 mois post-greffe mais concluent à une absence d'avantage compétitif due à l'absence de différence significative avec le contrôle.

En résumé ces souris KI restent un très bon modèle pouvant être utilisé pour des études pré-cliniques et tester l'effet de drogues sur la thrombocytose mais aussi sur l'évolution du clone malin au niveau des CSH et des progéniteurs.

Rôle des mutants sur l'hétérogénéité phénotypiques et fonctionnelles des CSH

Les travaux des équipes de Stenerik Jacobsen et Claus Nerlov ont montré que les CSH vWF$^+$ biaisées vers la lignée mégacaryocytaire résident au sommet de la pyramide hématopoïétique. Ces cellules sont capables de donner naissance aux CSH vWF$^-$ qui sont biaisées vers la lignée lymphoïde et ont un potentiel plus proche des ST-CSH (Sanjuan-Pla et al., 2013).

Les souris greffées avec des cellules WT vWF$^+$ ont des comptes plaquettaires normaux mais plus hauts que celles greffées avec des cellules vWF$^-$. De plus, la disparition de la population de CSH *+/+* vWF$^-$ initialement greffée et la prise de l'avantage des cellules compétitrices CD45.1xCD45.2 a permis de confirmer le caractère de reconstitution à court terme de ces cellules (ST-CSH). En revanche, nous avons pu constater que *CALRdel52* induit une thrombocytose en contexte vWF$^+$ comme vWF$^-$, mais plus importante en contexte vWF$^+$ liée probablement à une amplification spécifique de ces cellules qui sont déjà biaisées vers la lignée plaquettaire. Ces résultats concordent avec une étude transcriptomique, protéomique et fonctionnelle ayant montré un biais de l'hématopoïèse vers la lignée mégacaryocytaire chez les patients atteints de MF (*JAK2*^{V617F} et *CALRmut*) avec la présence de CSH présentant des gènes normalement associés aux MK notamment *vWF, ITG2Ab* et *PF4* (Psaila et al., 2020). Par ailleurs, nos résultats de scRNAseq montrent une augmentation de l'expression du vWF dans les CSH *del52/del52*, dont la fréquence est également augmentée par rapport aux souris WT et *ins5/ins5*.

En présence de *CALRdel52*, nous avons pu également constater la présence de CSH vWF$^+$ dans des souris greffées avec des CSH vWF$^-$, ce qui n'est pas le cas en contexte WT. Afin de confirmer si *CALRdel52* est capable de « reprogrammer » des CSH vWF$^-$ en CSH vWF$^+$, il sera nécessaire de reproduire des greffes de CSH vWF$^+$ et vWF$^-$ en l'absence d'autres CSH

compétitrices (contenues dans la MO WT de nos premières expériences, représentant un mélange indéterminable de cellules vWF$^+$ et vWF$^-$). Une greffe avec de la MO support déplétée en CSH (ou des cellules de rate) est donc envisagée très prochainement. Une suite à cette étude sera de retransplanter ces CSH vWF$^+$ et vWF$^-$ (s'il en reste en présence de *CALRdel52*) dans le cadre d'une greffe secondaire afin d'évaluer leur potentiel LT. Nous souhaitons savoir si la CSH *del52/del52* vWF$^-$ est capable de reconstituer l'hématopoïèse à LT contrairement à la CSH *+/+* vWF$^-$. Il faudra également réaliser ces expériences avec les souris KI *CALRins5*.

Des tests fonctionnels basés sur des essais clonogéniques (méthylcellulose ou coagulum plasmatiques) en milieux semi-solides pourraient aussi être réalisés afin d'étudier les types de colonies produites à partir des différents de cellules triées vWF$^+$ et vWF$^-$ portant ou non les *CALRmut.*

Il serait également intéressant de réaliser des expériences de scRNAseq afin de comparer les caractéristiques des CSH *+/+*, *del52/del52* et *ins5/ins5* vWF$^+$ et vWF$^-$. Nos résultats préliminaires de scRNAseq sur des LSK de souris *+/+* et KI *del52/del52* et *ins5/ins5* révèlent déjà une augmentation du nombre de CSH exprimant le vWF en présence de *CALRdel52* que nous n'observons pas avec *CALRins5*. Par ailleurs, nous avons pu détecter des CSH vWF$^+$ dans la rate en présence de *CALRdel52*. Nous étudierons les caractéristiques de ces cellules par scRNaseq en comparaison aux CSH de la MO afin de comprendre leur rôle dans l'aggravation du phénotype. Possèdent-elles la même signature transcriptomique que les CSH vWF$^+$ de la MO ?

Enfin, dans ces modèles de greffe, les MK hyperplasiques semblent être principalement visibles dans la MO des souris greffées avec les CSH vWF$^+$ et s'accompagnent d'une fibrose visible dans la MO. Les perspectives sont d'étudier le rôle des MK hyperplasiques dans la régulation des CSH. Des travaux ont déjà montré que les CSH vWF$^+$ et vWF$^-$ ne résident pas aux mêmes endroits dans la MO (Pinho et al., 2018). Les CSH vWF$^+$ sont associées aux MK et aux sinusoïdes tandis que les CSH vWF$^-$ sont associées aux artérioles. L'effet des *CALRmut* sur l'organisation des différentes niches serait une question à laquelle nous voudrions répondre éventuellement par des techniques de scRNAseq *spatial*.

D'autre part, les résultats de scRNAseq montrent une augmentation de l'expression du gène *S100a6* dans les CSH *CALRdel52*. Il a été montré que le KO de *S100a6* induit une diminution de la phosphorylation de AKT et un défaut d'auto-renouvèlement des CSH (Grahn

et al., 2020). Il serait intéressant de voir l'impact de l'invalidation de ce gène dans nos modèles de souris KI et de voir s'il joue un rôle dans l'avantage clonal des CSH mutées.

Étude des mécanismes responsables de l'avantage compétitif des CSH induit par les CALRmut.

Les résultats des analyses à l'échelle unicellulaire (CYTOF et scRNAseq) nous ont permis d'avancer dans la compréhension du mécanisme d'action de CALRdel52 et CALRins5.

Étonnamment, nous n'avons pas observé d'activation basale de la voie JAK2/STAT par CyTOF. Nous n'excluons tout de même pas la possibilité que cette voie soit activée surtout dans les cellules *CALRdel52* car nous observons une activation plus importante de ERK et d'AKT qu'avec *CALRins5*. Cette absence de significativité d'activation de la voie JAK2/STAT pourrait être due à son activation faible et donc difficilement quantifiable par CyTOF dans les CSH induites par les niveaux endogènes physiologiques de CALRmut. Néanmoins, le KO conditionnel dans la lignée hématopoïétique de *Jak2* induit un défaut du nombre de CSH. C'est pourquoi, cette voie doit être vraisemblablement active dans les CSH et suractivée par CALRdel52. Une façon d'y répondre serait d'évaluer l'impact du ruxolitinib (inhibiteur JAK1/2) sur l'activation des voies ERK et AKT.

Nous avons pu voir une diminution de l'expression intracellulaire de CALR que l'on retrouve en partie à la surface. En parallèle de ce résultat, nous avons également réalisé des dosages de CALR plasmatique par ELISA (Figure 25, Annexe) et nous avons confirmé les résultats obtenus par d'autres équipes que les CALRmut sont sécrétés dans le plasma sanguin (Liu et al., 2020 ; Pecquet et al., 2019b). Nous imaginons que la sécrétion de cette chaperonne du RE et acteur majeur de la régulation du calcium, perturbe l'homéostasie du RE. En effet, nous avons détecté une augmentation de l'expression du marqueur p-eIF2α associé à la réponse UPR de façon beaucoup plus importante dans les CSH *CALRdel52* que dans les CSH *CALRins5*. Plusieurs équipes ont déjà montré que les CALRmut induisent un stress du RE et une activation de la réponse UPR (Ibarra et al., 2022 ; Nam et al., 2019 ; Pronier et al., 2018 ; Salati et al., 2018). Cependant l'identité de la voie ou des voies de l'UPR activées en fonction du type de *CALRmut* varie en fonction du modèle cellulaire choisi dans les études et aucune étude n'a révélé l'activation de la voie PERK/eIF2α dans les CSH *CALRdel52* jusqu'à présent.

Basé sur nos résultats de CYTOF, nous supposons que dans les CSH *CALRdel52* la réponse au stress du RE, et particulièrement la voie PERK/ eIF2α est augmentée, comparée

aux CSH *CALRins5* bien que les deux types de CALRmut soient tous deux sécrétés de façon comparable (Figure 26, Annexe). Les résultats obtenus en scRNAseq confirment une augmentation de la réponse au stress du RE surtout dans le cas de *CALRdel52*. Une de nos hypothèses est un déséquilibre de la fonction mitochondriale liée à une accumulation de calcium cytosolique plus important avec CALRdel52 que CALRins5 pouvant résulter en une production de ROS qui pourraient être pris en charge par l'activation d'une réponse anti-oxydante de type NRF2 sous le contrôle de la voie PERK.

La prochaine étape consistera en la compréhension de l'origine de ce stress et sa possible implication dans l'avantage clonal des CSH *CALRdel52*. La différence majeure entre les deux mutants CALRdel52 et CALRins5 est le nombre résiduel de charges négatives du domaine C-terminal permettant la liaison aux ions Ca^{2+} et le maintien de l'homéostasie calcique (Klampfl et al., 2013 ; Pietra et al., 2016). De plus, la sécrétion de cette chaperonne du RE a un impact, non seulement sur la concentration calcique mais aussi sur le repliement des protéines membranaires et sécrétées. Nous imaginons donc que les quantités résiduelles de CALRins5 retiennent plus de calcium que CALRdel52.

Notre but sera donc d'évaluer l'accumulation d'agrégats de protéines mal repliées dans les CSH. Nous avons déjà commencé à étudier cette piste en utilisant une sonde Protéostat capable de s'intégrer dans les cavités des agrégats de protéines mal repliées et émettre un signal fluorescent. Nous avons donc incubé des cellules de MO marquées pour les CSH (SLAM) avec cette sonde et analysé les résultats par cytométrie en flux (Figure 23).

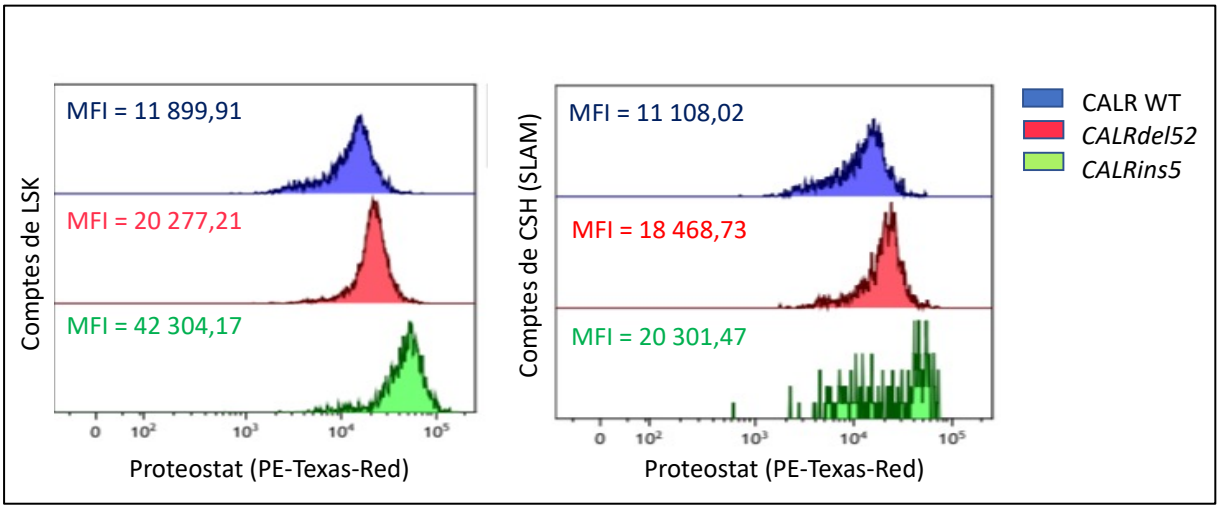


Figure 23 Analyse de l'accumulation de protéines mal repliées avec la sonde Protéostat dans les CSH et les progéniteurs (n=1).

Les résultats préliminaires semblent suggérer une plus forte accumulation des protéines mal repliées dans les CSH *CALRins5* par rapport aux *CALRdel52* et CALRWT surtout

dans les progéniteurs LSK qui regroupent les CSH et les MPP mais moins dans les CSH (SLAM). On peut peut-être imaginer que cette accumulation est caractéristique d'un type de MPP en particulier. Ces expériences sont évidemment à reproduire et à confirmer.

Il a, par ailleurs, été décrit dans la littérature que les voies de l'UPR étaient impliquées dans l'auto-renouvèlement des CSH (van Galen et al., 2014 ; Luchsinger, 2021). Nous comptons explorer ces hypothèses *in vitro* et *in vivo* en utilisant des inhibiteurs de la réponse au stress du RE, notamment de la voie PERK, le GSK2656157. Nous avons comme hypothèse que l'inhibition de cette réponse au stress pourrait induire l'apoptose des cellules *CALRdel52*.

Par ailleurs, il sera judicieux d'explorer les autres voies de l'UPR afin de vérifier quelles voies sont activées par les CALRmut, et de voir si la CALRins5 répond néanmoins au stress du RE mais par un mécanisme différent de la CALRdel52. Il a déjà été montré que CALRins5 activait plus fortement la voie ATF6 de l'UPR nécessaire à leur survie et leur prolifération que les cellules exprimant CALRdel52 qui semblent plutôt dépendantes de la voie IRE/XBP1 dans des cellules de patients atteints de NMP (Arellano et al., 2021 ; Ibarra et al., 2022).

Pour aller plus loin, nous avons confirmé par RNAseq des résultats de l'équipe de Tony Green montrant la dérégulation des voies de biosynthèse du cholestérol par CALRdel52 (Prins et al., 2020). Il a été rapporté que la perte de CALR induit une dérégulation de l'homéostasie lipidique dépendante du cholestérol et que l'efflux de cholestérol jouent un rôle dans la mobilisation des CSH et de leurs progéniteurs. En effet, le défaut d'efflux de cholestérol dans un modèle de souris déficient pour les transporteurs ABCA1 et ABCG1 conduit à une expansion des CSH dans la MO et à leur mobilisation induisant une hématopoïèse extramédullaire et donc une splénomégalie (Wang et al., 2017 ; Westerterp et al., 2012). Il serait envisageable de tester des traitements avec des statines, molécules hypolipémiantes qui permettront d'abaisser les niveaux de cholestérol et de voir l'impact sur le phénotype des souris KI.

D'autre part, la sécrétion de CALRmut pourrait faire l'objet de stratégie thérapeutique utilisant des anticorps ciblant les CALRmut qui permettrait d'inhiber son activité de ligand. L'équipe de Robert Kralovics a d'ailleurs montré que le traitement des souris pendant 48h avec un anticorps dirigé contre les CALRmut induit une diminution de la thrombocytose et des LSK à 6h post-administration (Achyutuni et al., 2021). Une équipe australienne a également montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre les CALRmut inhibe l'activation constitutive de la voie JAK2/STAT et cible spécifiquement les progéniteurs mégacaryocytaires et la différenciation en mégacaryocytes des cellules issues de patients

mutés CALR mais pas ceux portant *JAK2*^{V617F}. De plus, ce traitement conduit à une augmentation de la survie des souris xénogreffées avec des cellules de lignée TF-1 exprimant MPL et CALR^{del61}. La stratégie et le modèle utilisé n'ont pas permis d'évaluer l'effet de cet anticorps sur les comptes plaquettaires ou sur l'avantage compétitif (Tvorogov et al., 2022). Il serait pertinent dans le futur de tester un traitement utilisant un anticorps dirigé contre les CALRmut, en premier lieu dans un système physiologique, et de voir son effet sur les paramètres sanguins. En outre, il faudrait réaliser des greffes compétitives afin d'évaluer l'effet de cette immunothérapie sur l'avantage compétitif des cellules mutantes. Y-t-il un effet sur le pourcentage de cellules mutées ? Est-ce un effet à long-terme ? Y-a-t-il une reprise à l'arrêt du traitement ? Et comprendre le mécanisme d'action de ces anticorps sur les CALRmut.

En conclusion, au cours de ma thèse, je suis parvenue à caractériser l'hématopoïèse de mes deux modèles de souris KI. Ceci permet aujourd'hui de les utiliser comme modèles précliniques pour tester des drogues ciblant les *CALRmut* mais aussi comme un outil pour la compréhension des mécanismes qui participent au développement des NMP *CALRmut.* Les premières pistes se présentant à nous sont :

- de tester l'impact de la réponse au stress du RE qui est différentielle entre les deux mutants CALRdel52 et CALRins5 et pourrait jouer un rôle dans la différence d'amplification du compartiment des CSH. Le ciblage de cette voie pourrait faire l'objet d'une nouvelle piste thérapeutique qui serait un espoir dans l'éradication des cellules *CALRmut* et une avancée dans les traitements des NMP.

- de tester l'impact des immunothérapies anti-CALR dans le modèle de souris *CALRmut*.

Bibliographie

Abdel-Wahab O. I., Levine R. L. « Primary myelofibrosis: update on definition, pathogenesis, and treatment ». *Annu. Rev. Med.* [En ligne]. 2009. Vol. 60, p. 233-245. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.041707.160528 >

Achyutuni S., Nivarthi H., Majoros A., Hug E., Schueller C., Jia R., Varga C., Schuster M., Senekowitsch M., Tsiantoulas D., Kavirayani A., Binder C. J., Bock C., Zagrijtschuk O., Kralovics R. « Hematopoietic expression of a chimeric murine-human CALR oncoprotein allows the assessment of anti-CALR antibody immunotherapies in vivo ». *Am. J. Hematol.* [En ligne]. 2021. Vol. 96, n°6, p. 698-707. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/ajh.26171 >

Adolfsson J., Borge O. J., Bryder D., Theilgaard-Mönch K., Astrand-Grundström I., Sitnicka E., Sasaki Y., Jacobsen S. E. « Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity ». *Immunity* [En ligne]. octobre 2001. Vol. 15, n°4, p. 659-669. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00220-5 >

Alexander W. S., Roberts A. W., Nicola N. A., Li R., Metcalf D. « Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl ». *Blood*. 15 mars 1996. Vol. 87, n°6, p. 2162-2170.

Antony-Debré I., Bluteau D., Itzykson R., Baccini V., Renneville A., Boehlen F., Morabito M., Droin N., Deswarte C., Chang Y., Leverger G., Solary E., Vainchenker W., Favier R., Raslova H. « MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations ». *Blood* [En ligne]. 27 septembre 2012. Vol. 120, n°13, p. 2719-2722. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2012-04-422352 >

Arai F., Hirao A., Ohmura M., Sato H., Matsuoka S., Takubo K., Ito K., Koh G. Y., Suda T. « Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche ». *Cell* [En ligne]. 23 juillet 2004. Vol. 118, n°2, p. 149-161. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.004 >

Araki M., Yang Y., Imai M., Mizukami Y., Kihara Y., Sunami Y., Masubuchi N., Edahiro Y., Hironaka Y., Osaga S., Ohsaka A., Komatsu N. « Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation ». *Leukemia* [En ligne]. janvier 2019. Vol. 33, n°1, p. 122-131. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41375-018-0181-2 >

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., Bloomfield C. D., Cazzola M., Vardiman J. W. « The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia ». *Blood* [En ligne]. 19 mai 2016a. Vol. 127, n°20, p. 2391-2405. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544 >

Arber D. A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M. J., Le Beau M. M., Bloomfield C. D., Cazzola M., Vardiman J. W. « The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia ». *Blood* [En ligne]. 19 mai 2016b. Vol. 127, n°20, p. 2391-2405. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-643544 >

Arellano N. S., Kurylowicz K., Maxwell L., Greenbaum H. S., Ibarra J., Elf S. « Myeloproliferative

Neoplasm-Associated Type 2 Calreticulin Mutations Differentially Activate and Depend on the ATF6 Pathway of the UPR ». *Blood* [En ligne]. 23 novembre 2021. Vol. 138, p. 3588. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2021-151632 >

Bacon C. M., Justin Tortolani P., Shimosaka A., Rees R. C., Longo D. L., O'Shea J. J. « Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3 ». *FEBS Lett.* [En ligne]. 14 août 1995. Vol. 370, n°1-2, p. 63-68. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00796-C >

Balligand T., Achouri Y., Pecquet C., Gaudray G., Colau D., Hug E., Rahmani Y., Stroobant V., Plo I., Vainchenker W., Kralovics R., Van den Eynde B. J., Defour J.-P., Constantinescu S. N. « Knock-in of murine Calr del52 induces essential thrombocythemia with slow-rising dominance in mice and reveals key role of Calr exon 9 in cardiac development ». *Leukemia* [En ligne]. février 2020. Vol. 34, n°2, p. 510-521. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41375-019-0538-1 >

Barbui T., Thiele J., Gisslinger H., Kvasnicka H. M., Vannucchi A. M., Guglielmelli P., Orazi A., Tefferi A. « The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion ». *Blood Cancer J.* [En ligne]. 9 février 2018a. Vol. 8, n°2, p. 15. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y >

Barbui T., Thiele J., Gisslinger H., Kvasnicka H. M., Vannucchi A. M., Guglielmelli P., Orazi A., Tefferi A. « The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion ». *Blood Cancer J.* [En ligne]. 9 février 2018b. Vol. 8, n°2, p. 15. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41408-018-0054-y >

Bedard K., Szabo E., Michalak M., Opas M. « Cellular Functions of Endoplasmic Reticulum Chaperones Calreticulin, Calnexin, and ERp57 ». In : *Int. Rev. Cytol.* [En ligne]. [s.l.] : Academic Press, 2005. p. 91-121. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)45004-4 > (consulté le 23 septembre 2022)

Beerman I., Bhattacharya D., Zandi S., Sigvardsson M., Weissman I. L., Bryder D., Rossi D. J. « Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 23 mars 2010. Vol. 107, n°12, p. 5465-5470. Disponible sur : < https://doi.org/10.1073/pnas.1000834107 >

Besancenot R., Chaligné R., Tonetti C., Pasquier F., Marty C., Lécluse Y., Vainchenker W., Constantinescu S. N., Giraudier S. « A Senescence-Like Cell-Cycle Arrest Occurs During Megakaryocytic Maturation: Implications for Physiological and Pathological Megakaryocytic Proliferation ». *PLOS Biol.* [En ligne]. 7 septembre 2010. Vol. 8, n°9, p. e1000476. Disponible sur : < https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000476 >

Birgegård G. « The Use of Anagrelide in Myeloproliferative Neoplasms, with Focus on Essential Thrombocythemia ». *Curr. Hematol. Malig. Rep.* [En ligne]. 1 octobre 2016. Vol. 11, n°5, p. 348-355. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/s11899-016-0335-0 >

Blumenreich M. S. « The White Blood Cell and Differential Count ». In : Walker HK, Hall WD, Hurst JW (éd.). *Clin. Methods Hist. Phys. Lab. Exam.* [En ligne]. Boston : Butterworths, 1990.

Disponible sur : < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK261/ > (consulté le 5 août 2022)ISBN : 978-0-409-90077-4.

Bradley T., Metcalf D. « The Growth of Mouse Bone Marrow Cells in Vitro ». *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* [En ligne]. 1966. Vol. 44, n°3, p. 287-300. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/icb.1966.28 >

Brown G. C., Neher J. J. « Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: "phagoptosis" ». *Trends Biochem. Sci.* [En ligne]. août 2012. Vol. 37, n°8, p. 325-332. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.05.002 >

Buenrostro J. D., Corces M. R., Lareau C. A., Wu B., Schep A. N., Aryee M. J., Majeti R., Chang H. Y., Greenleaf W. J. « Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation ». *Cell* [En ligne]. 31 mai 2018. Vol. 173, n°6, p. 1535-1548.e16. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.074 >

Cabagnols X., Defour J. P., Ugo V., Ianotto J. C., Mossuz P., Mondet J., Girodon F., Alexandre J. H., Mansier O., Viallard J. F., Lippert E., Murati A., Mozziconacci M. J., Saussoy P., Vekemans M. C., Knoops L., Pasquier F., Ribrag V., Solary E., Plo I., Constantinescu S. N., Casadevall N., Vainchenker W., Marzac C., Bluteau O. « Differential association of calreticulin type 1 and type 2 mutations with myelofibrosis and essential thrombocytemia: relevance for disease evolution ». *Leukemia* [En ligne]. janvier 2015. Vol. 29, n°1, p. 249-252. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/leu.2014.270 >

Cabezas-Wallscheid N., Klimmeck D., Hansson J., Lipka D. B., Reyes A., Wang Q., Weichenhan D., Lier A., Von Paleske L., Renders S., Wünsche P., Zeisberger P., Brocks D., Gu L., Herrmann C., Haas S., Essers M. A. G., Brors B., Eils R., Huber W., Milsom M. D., Plass C., Krijgsveld J., Trumpp A. « Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. 2 octobre 2014. Vol. 15, n°4, p. 507-522. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.07.005 >

Carroll D., St. Clair D. K. « Hematopoietic Stem Cells: Normal Versus Malignant ». *Antioxid. Redox Signal.* [En ligne]. 1 décembre 2018. Vol. 29, n°16, p. 1612-1632. Disponible sur : < https://doi.org/10.1089/ars.2017.7326 >

Cervantes F., Dupriez B., Pereira A., Passamonti F., Reilly J. T., Morra E., Vannucchi A. M., Mesa R. A., Demory J.-L., Barosi G., Rumi E., Tefferi A. « New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment ». *Blood* [En ligne]. 26 mars 2009. Vol. 113, n°13, p. 2895-2901. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170449 >

Chachoua I., Pecquet C., El-Khoury M., Nivarthi H., Albu R.-I., Marty C., Gryshkova V., Defour J.-P., Courtoy P. J., Choong M. L., Plo I., Vainchenker W., Kralovics R., Constantinescu S. N. « Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants ». 2016. Vol. 127, n°10, p. 12.

Chakravarti A., Allaeys I., Poubelle P. E. « Neutrophile et immunité - Est-ce inné ou acquis ? ». *médecine/sciences* [En ligne]. 1 octobre 2007. Vol. 23, n°10, p. 862-867. Disponible sur : <

https://doi.org/10.1051/medsci/20072310862 >

Challen G. A., Boles N., Lin K. K., Goodell M. A. « Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis ». *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* [En ligne]. janvier 2009. Vol. 75, n°1, p. 14-24. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/cyto.a.20674 >

Chang Y., Bluteau D., Debili N., Vainchenker W. « From hematopoietic stem cells to platelets ». *J. Thromb. Haemost.* [En ligne]. 2007. Vol. 5, n°s1, p. 318-327. Disponible sur : < https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02472.x >

Chapman R., Sidrauski C., Walter P. « Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus ». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* [En ligne]. 1 février 1998. Vol. 14, p. 459-85. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.14.1.459 >

Chow D. C., Wenning L. A., Miller W. M., Papoutsakis E. T. « Modeling pO2 Distributions in the Bone Marrow Hematopoietic Compartment. I. Krogh's Model ». *Biophys. J.* [En ligne]. 1 août 2001. Vol. 81, n°2, p. 675-684. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75732-3 >

Clark S., Ma A., Tavener S., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M., Patel K., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G., Keys E., Allen-Vercoe E., Devinney R., Doig C., Green F., Kubes P. « Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood ». *Nat. Med.* [En ligne]. 1 mai 2007. Vol. 13, p. 463-9. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/nm1565 >

Cleyrat C., Darehshouri A., Steinkamp M. P., Vilaine M., Boassa D., Ellisman M. H., Hermouet S., Wilson B. S. « Mpl Traffics to the Cell Surface Through Conventional and Unconventional Routes ». *Traffic* [En ligne]. 2014. Vol. 15, n°9, p. 961-982. Disponible sur : < https://doi.org/10.1111/tra.12185 >

Cook K. L., Clarke R. « Heat shock 70 kDa protein 5/glucose-regulated protein 78 "AMP"ing up autophagy ». *Autophagy* [En ligne]. 1 décembre 2012. Vol. 8, n°12, p. 1827-1829. Disponible sur : < https://doi.org/10.4161/auto.21765 >

Copley M. R., Beer P. A., Eaves C. J. « Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity Takes Center Stage ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. 14 juin 2012. Vol. 10, n°6, p. 690-697. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.006 >

Coppolino M. G., Woodside M. J., Demaurex N., Grinstein S., St-Arnaud R., Dedhar S. « Calreticulin is essential for integrin-mediated calcium signalling and cell adhesion ». *Nature* [En ligne]. avril 1997. Vol. 386, n°6627, p. 843-847. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/386843a0 >

Crisan M., Dzierzak E. « The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity ». *Dev. Camb. Engl.* [En ligne]. 15 décembre 2016. Vol. 143, n°24, p. 4571-4581. Disponible sur : < https://doi.org/10.1242/dev.114231 >

Culyba E. K., Price J. L., Hanson S. R., Dhar A., Wong C.-H., Gruebele M., Powers E. T., Kelly J. W. « Protein Native State Stabilization by Placing Aromatic Side Chains in N-Glycosylated Reverse Turns ». *Science* [En ligne]. 4 février 2011. Vol. 331, n°6017, p. 571-575. Disponible sur : <

https://doi.org/10.1126/science.1198461 >

Czech J., Cordua S., Weinbergerova B., Baumeister J., Crepcia A., Han L., Maié T., Costa I. G., Denecke B., Maurer A., Schubert C., Feldberg K., Gezer D., Brümmendorf T. H., Müller-Newen G., Mayer J., Racil Z., Kubesova B., Knudsen T., Sørensen A. L., Holmström M., Kjær L., Skov V., Larsen T. S., Hasselbalch H. C., Chatain N., Koschmieder S. « JAK2V617F but not CALR mutations confer increased molecular responses to interferon-α via JAK1/STAT1 activation ». *Leukemia* [En ligne]. avril 2019. Vol. 33, n°4, p. 995-1010. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41375-018-0295-6 >

Dahlin J. S., Hamey F. K., Pijuan-Sala B., Shepherd M., Lau W. W. Y., Nestorowa S., Weinreb C., Wolock S., Hannah R., Diamanti E., Kent D. G., Göttgens B., Wilson N. K. « A single-cell hematopoietic landscape resolves 8 lineage trajectories and defects in Kit mutant mice ». *Blood* [En ligne]. 24 mai 2018. Vol. 131, n°21, p. e1-e11. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2017-12-821413 >

Davis E., Corash L., Stenberg P., Levin J. « Histologic studies of splenic megakaryocytes after bone marrow ablation with strontium 90 ». *J. Lab. Clin. Med.* novembre 1992. Vol. 120, n°5, p. 767-777.

Debili N., Wendling F., Cosman D., Titeux M., Florindo C., Dusanter-Fourt I., Schooley K., Methia N., Charon M., Nador R., Bettaieb A., Vainchenker W. « The Mpl Receptor Is Expressed in the Megakaryocytic Lineage From Late Progenitors to Platelets ». *Blood* [En ligne]. 15 janvier 1995. Vol. 85, n°2, p. 391-401. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.V85.2.391.391 >

Di Buduo C. A., Abbonante V., Marty C., Moccia F., Rumi E., Pietra D., Soprano P. M., Lim D., Cattaneo D., Iurlo A., Gianelli U., Barosi G., Rosti V., Plo I., Cazzola M., Balduini A. « Defective interaction of mutant calreticulin and SOCE in megakaryocytes from patients with myeloproliferative neoplasms ». *Blood* [En ligne]. 9 janvier 2020. Vol. 135, n°2, p. 133-144. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.2019001103 >

Domen J., Weissman I. L. « Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate ». *Mol. Med. Today* [En ligne]. 1 mai 1999. Vol. 5, n°5, p. 201-208. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S1357-4310(99)01464-1 >

Donadieu J., Beaupain B., Bellanné-Chantelot C. « Granulopoïèse et leucémogenèse - Ce que nous apportent les neutropénies congénitales ». *médecine/sciences* [En ligne]. 1 mars 2008. Vol. 24, n°3, p. 284-289. Disponible sur : < https://doi.org/10.1051/medsci/2008243284 >

Duployez N., Martin J.-E., Khalife-Hachem S., Benkhelil R., Saada V., Marzac C., Auger N., Marceau-Renaut A., Favier R., Ballerini P., Caron O., Baruchel A., De Botton S., Preudhomme C., Micol J.-B., Raslova H., Antony-Debré I. « Germline RUNX1 Intragenic Deletion: Implications for Accurate Diagnosis of FPD/AML ». *HemaSphere* [En ligne]. 2 avril 2019. Vol. 3, n°3, p. e203. Disponible sur : < https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000203 >

Dupont S., Massé A., James C., Teyssandier I., Lécluse Y., Larbret F., Ugo V., Saulnier P., Koscielny S., Le Couédic J. P., Casadevall N., Vainchenker W., Delhommeau F. « The JAK2 617V>F mutation triggers erythropoietin hypersensitivity and terminal erythroid amplification in primary cells from patients with polycythemia vera ». *Blood* [En ligne]. 1 août 2007. Vol. 110,

n°3, p. 1013-1021. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-054940 >

Dykstra B., Kent D., Bowie M., McCaffrey L., Hamilton M., Lyons K., Lee S.-J., Brinkman R., Eaves C. « Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. 16 août 2007. Vol. 1, n°2, p. 218-229. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.05.015 >

Eaton N., Boyd E. K., Biswas R., Lee-Sundlov M. M., Dlugi T. A., Ramsey H. E., Zheng S., Burns R. T., Sola-Visner M. C., Hoffmeister K. M., Falet H. « Endocytosis of the thrombopoietin receptor Mpl regulates megakaryocyte and erythroid maturation in mice ». *Front. Oncol.* [En ligne]. 30 août 2022. Vol. 12, p. 959806. Disponible sur : < https://doi.org/10.3389/fonc.2022.959806 >

Elf S., Abdelfattah N. S., Chen E., Perales-Patón J., Rosen E. A., Ko A., Peisker F., Florescu N., Giannini S., Wolach O., Morgan E. A., Tothova Z., Losman J.-A., Schneider R. K., Al-Shahrour F., Mullally A. « Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation ». *Cancer Discov.* [En ligne]. 1 avril 2016. Vol. 6, n°4, p. 368-381. Disponible sur : < https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-1434 >

El-Khoury M., Cabagnols X., Mosca M., Vertenoeil G., Marzac C., Favale F., Bluteau O., Lorre F., Tisserand A., Rabadan Moraes G., Ugo V., Ianotto J.-C., Rey J., Solary E., Roy L., Rameau P., Debili N., Pasquier F., Casadevall N., Marty C., Constantinescu S. N., Raslova H., Vainchenker W., Plo I. « Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms ». *Oncogene* [En ligne]. juillet 2020a. Vol. 39, n°31, p. 5323-5337. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41388-020-1368-3 >

El-Khoury M., Cabagnols X., Mosca M., Vertenoeil G., Marzac C., Favale F., Bluteau O., Lorre F., Tisserand A., Rabadan Moraes G., Ugo V., Ianotto J.-C., Rey J., Solary E., Roy L., Rameau P., Debili N., Pasquier F., Casadevall N., Marty C., Constantinescu S. N., Raslova H., Vainchenker W., Plo I. « Different impact of calreticulin mutations on human hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms ». *Oncogene* [En ligne]. juillet 2020b. Vol. 39, n°31, p. 5323-5337. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41388-020-1368-3 >

Ellgaard L., Frickel E.-M. « Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding ». *Cell Biochem. Biophys.* [En ligne]. 2003. Vol. 39, n°3, p. 223-247. Disponible sur : < https://doi.org/10.1385/CBB:39:3:223 >

Ellis R. J., Van der Vies S. M. « Molecular chaperones ». *Annu. Rev. Biochem.* [En ligne]. 1991. Vol. 60, p. 321-347. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev.bi.60.070191.001541 >

Ezumi Y., Takayama H., Okuma M. « Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro ». *FEBS Lett.* [En ligne]. 23 octobre 1995. Vol. 374, n°1, p. 48-52. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)01072-M >

Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H. M. « The biology of chronic myeloid leukemia ». *N. Engl. J. Med.* [En ligne]. 15 juillet 1999. Vol. 341, n°3, p. 164-172. Disponible sur : < https://doi.org/10.1056/NEJM199907153410306 >

Finazzi G., Rambaldi A., Guerini V., Carobbo A., Barbui T. « Risk of thrombosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera according to JAK2 V617F mutation status ». *Haematologica* [En ligne]. janvier 2007. Vol. 92, n°1, p. 135-136. Disponible sur : < https://doi.org/10.3324/haematol.10634 >

Fowlkes S., Murray C., Fulford A., De Gelder T., Siddiq N. « Myeloproliferative neoplasms (MPNs) – Part 1: An overview of the diagnosis and treatment of the "classical" MPNs ». *Can. Oncol. Nurs. J.* [En ligne]. 1 octobre 2018. Vol. 28, n°4, p. 262-268. Disponible sur : < https://doi.org/10.5737/23688076284262268 >

Fox N., Priestley G., Papayannopoulou T., Kaushansky K. « Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation ». *J. Clin. Invest.* [En ligne]. 1 août 2002. Vol. 110, n°3, p. 389-394. Disponible sur : < https://doi.org/10.1172/JCI15430 >

Van Galen P., Kreso A., Mbong N., Kent D. G., Fitzmaurice T., Chambers J. E., Xie S., Laurenti E., Hermans K., Eppert K., Marciniak S. J., Goodall J. C., Green A. R., Wouters B. G., Wienholds E., Dick J. E. « The unfolded protein response governs integrity of the haematopoietic stem-cell pool during stress ». *Nature* [En ligne]. juin 2014. Vol. 510, n°7504, p. 268-272. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/nature13228 >

Gardai S. J., Xiao Y.-Q., Dickinson M., Nick J. A., Voelker D. R., Greene K. E., Henson P. M. « By Binding SIRPα or Calreticulin/CD91, Lung Collectins Act as Dual Function Surveillance Molecules to Suppress or Enhance Inflammation ». *Cell* [En ligne]. 3 octobre 2003. Vol. 115, n°1, p. 13-23. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00758-X >

Garg A. D., Krysko D. V., Verfaillie T., Kaczmarek A., Ferreira G. B., Marysael T., Rubio N., Firczuk M., Mathieu C., Roebroek A. J. M., Annaert W., Golab J., De Witte P., Vandenabeele P., Agostinis P. « A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death ». *EMBO J.* [En ligne]. 7 mars 2012. Vol. 31, n°5, p. 1062-1079. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/emboj.2011.497 >

Geddis A. E., Fox N. E., Kaushansky K. « Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Necessary but Not Sufficient for Thrombopoietin-induced Proliferation in Engineered Mpl-bearing Cell Lines as Well as in Primary Megakaryocytic Progenitors * ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 14 septembre 2001. Vol. 276, n°37, p. 34473-34479. Disponible sur : < https://doi.org/10.1074/jbc.M105178200 >

Gekas C., Graf T. « CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age ». *Blood* [En ligne]. 30 mai 2013. Vol. 121, n°22, p. 4463-4472. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2012-09-457929 >

Geyer H. L., Mesa R. A. « Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? ». *Blood* [En ligne]. 4 décembre 2014. Vol. 124, n°24, p. 3529-3537. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-577635 >

Gomes A. L., Carvalho T., Serpa J., Torre C., Dias S. « Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1:CXCR4 axis ». *Blood* [En ligne]. 13 mai 2010. Vol. 115, n°19, p. 3886-3894. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-240580 >

Grahn T. H. M., Niroula A., Végvári Á., Oburoglu L., Pertesi M., Warsi S., Safi F., Miharada N., Garcia S. C., Siva K., Liu Y., Rörby E., Nilsson B., Zubarev R. A., Karlsson S. « S100A6 is a critical regulator of hematopoietic stem cells ». *Leukemia* [En ligne]. décembre 2020. Vol. 34, n°12, p. 3323-3337. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41375-020-0901-2 >

Grisouard J., Hao-Shen H., Dirnhofer S., Wagner K.-U., Skoda R. C. « Selective deletion of Jak2 in adult mouse hematopoietic cells leads to lethal anemia and thrombocytopenia ». *Haematologica* [En ligne]. avril 2014. Vol. 99, n°4, p. e52-e54. Disponible sur : < https://doi.org/10.3324/haematol.2013.100016 >

Grozovsky R., Giannini S., Falet H., Hoffmeister K. M. « Novel mechanisms of platelet clearance and thrombopoietin regulation ». *Curr. Opin. Hematol.* [En ligne]. septembre 2015. Vol. 22, n°5, p. 445-451. Disponible sur : < https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000170 >

Gudz T. I., Schneider T. E., Haas T. A., Macklin W. B. « Myelin Proteolipid Protein Forms a Complex with Integrins and May Participate in Integrin Receptor Signaling in Oligodendrocytes ». *J. Neurosci.* [En ligne]. 1 septembre 2002. Vol. 22, n°17, p. 7398-7407. Disponible sur : < https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-17-07398.2002 >

Haas S., Trumpp A., Milsom M. D. « Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. 3 mai 2018. Vol. 22, n°5, p. 627-638. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.003 >

Hanson S. R., Culyba E. K., Hsu T.-L., Wong C.-H., Kelly J. W., Powers E. T. « The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability ». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* [En ligne]. 3 mars 2009. Vol. 106, n°9, p. 3131-3136. Disponible sur : < https://doi.org/10.1073/pnas.0810318105 >

Harding H. P., Zhang Y., Ron D. « Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase ». *Nature* [En ligne]. 21 janvier 1999. Vol. 397, n°6716, p. 271-274. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/16729 >

Hegde A. N. « The ubiquitin-proteasome pathway and synaptic plasticity ». *Learn. Mem.* [En ligne]. juillet 2010. Vol. 17, n°7, p. 314-327. Disponible sur : < https://doi.org/10.1101/lm.1504010 >

Heppner J., Nguyen L. T., Guo M., Naugler C., Rashid-Kolvear F. « Incidence of myeloproliferative neoplasms in Calgary, Alberta, Canada ». *BMC Res. Notes* [En ligne]. 24 mai 2019. Vol. 12, n°1, p. 286. Disponible sur : < https://doi.org/10.1186/s13104-019-4321-1 >

Hitchcock I. S., Chen M. M., King J. R., Kaushansky K. « YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation ». *Blood* [En ligne]. 15 septembre 2008. Vol. 112, n°6, p. 2222-2231. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134049 >

How J., Hobbs G. S., Mullally A. « Mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms ». *Blood* [En ligne]. 19 décembre 2019. Vol. 134, n°25, p. 2242-2248. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.2019000622 >

Ibarra J., Elbanna Y. A., Kurylowicz K., Ciboddo M., Greenbaum H. S., Arellano N. S., Rodriguez D., Evers M., Bock-Hughes A., Liu C., Smith Q., Lutze J., Baumeister J., Kalmer M., Olschok K., Nicholson B., Silva D., Maxwell L., Dowgielewicz J., Rumi E., Pietra D., Casetti I. C., Catricala S., Koschmieder S., Gurbuxani S., Schneider R. K., Oakes S. A., Elf S. E. « Type I but Not Type II Calreticulin Mutations Activate the IRE1α/XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response to Drive Myeloproliferative Neoplasms ». *Blood Cancer Discov.* [En ligne]. 6 juillet 2022. Vol. 3, n°4, p. 298-315. Disponible sur : < https://doi.org/10.1158/2643-3230.BCD-21-0144 >

Ichikawa Y., Pluznik D. H., Sachs L. « In vitro control of the development of macrophage and granulocyte colonies. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* août 1966. Vol. 56, n°2, p. 488-495.

Jacobson L. O., Simmons E. L., Marks E. K., Eldredge J. H. « Recovery from Radiation Injury ». *Science* [En ligne]. 4 mai 1951. Vol. 113, n°2940, p. 510-511. Disponible sur : < https://doi.org/10.1126/science.113.2940.510 >

James C., Ugo V., Le Couédic J.-P., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C., Garçon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval J. L., Constantinescu S. N., Casadevall N., Vainchenker W. « A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera ». *Nature* [En ligne]. avril 2005. Vol. 434, n°7037, p. 1144-1148. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/nature03546 >

Jutzi J. S., Marneth A. E., Ciboddo M., Guerra-Moreno A., Jiménez-Santos M. J., Kosmidou A., Dressman J. W., Liang H., Hamel R. S. L., Lozano P. R., Rumi E., Doench J., Gotlib J. R., Krishnan A., Elf S., Al-Shahrour F., Mullally A. « Whole-genome CRISPR screening identifies N-glycosylation as a genetic and therapeutic vulnerability in CALR-mutant MPN ». *Blood* [En ligne]. 28 juin 2022. p. blood.2022015629. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.2022015629 >

Kadowaki H., Nishitoh H. « Signaling pathways from the endoplasmic reticulum and their roles in disease ». *Genes* [En ligne]. 1 juillet 2013. Vol. 4, n°3, p. 306-333. Disponible sur : < https://doi.org/10.3390/genes4030306 >

Kaushansky K., Lok S., Holly R. D., Broudy V. C., Lin N., Bailey M. C., Forstrom J. W., Buddle M. M., Oort P. J., Hagen F. S., Roth G. J., Papayannopoulou T., Foster D. C. « Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin ». *Nature* [En ligne]. juin 1994. Vol. 369, n°6481, p. 568-571. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/369568a0 >

Khoury J. D., Solary E., Abla O., Akkari Y., Alaggio R., Apperley J. F., Bejar R., Berti E., Busque L., Chan J. K. C., Chen W., Chen X., Chng W.-J., Choi J. K., Colmenero I., Coupland S. E., Cross N. C. P., De Jong D., Elghetany M. T., Takahashi E., Emile J.-F., Ferry J., Fogelstrand L., Fontenay M., Germing U., Gujral S., Haferlach T., Harrison C., Hodge J. C., Hu S., Jansen J. H., Kanagal-Shamanna R., Kantarjian H. M., Kratz C. P., Li X.-Q., Lim M. S., Loeb K., Loghavi S., Marcogliese A., Meshinchi S., Michaels P., Naresh K. N., Natkunam Y., Nejati R., Ott G., Padron E., Patel K. P., Patkar N., Picarsic J., Platzbecker U., Roberts I., Schuh A., Sewell W., Siebert R., Tembhare P., Tyner J., Verstovsek S., Wang W., Wood B., Xiao W., Yeung C., Hochhaus A. « The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms ». *Leukemia* [En ligne]. 2022. Vol. 36, n°7, p. 1703-1719. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41375-022-01613-1 >

Kiladjian J.-J., Cassinat B., Chevret S., Turlure P., Cambier N., Roussel M., Bellucci S., Grandchamp B., Chomienne C., Fenaux P. « Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera ». *Blood* [En ligne]. 15 octobre 2008. Vol. 112, n°8, p. 3065-3072. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2008-03-143537 >

Kim S.-J., Davis R. P., Jenne C. N. « Platelets as Modulators of Inflammation ». *Semin. Thromb. Hemost.* [En ligne]. mars 2018. Vol. 44, n°2, p. 91-101. Disponible sur : < https://doi.org/10.1055/s-0037-1607432 >

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.* 3 février 1998. Vol. 95, n°3, p. 1195-1200.

Klampfl T., Gisslinger H., Harutyunyan A. S., Nivarthi H., Rumi E., Milosevic J. D., Them N. C. C., Berg T., Gisslinger B., Pietra D., Chen D., Vladimer G. I., Bagienski K., Milanesi C., Casetti I. C., Sant'Antonio E., Ferretti V., Elena C., Schischlik F., Cleary C., Six M., Schalling M., Schönegger A., Bock C., Malcovati L., Pascutto C., Superti-Furga G., Cazzola M., Kralovics R. « Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms ». *N. Engl. J. Med.* [En ligne]. 19 décembre 2013. Vol. 369, n°25, p. 2379-2390. Disponible sur : < https://doi.org/10.1056/NEJMoa1311347 >

Kobayashi H., Morikawa T., Okinaga A., Hamano F., Hashidate-Yoshida T., Watanuki S., Hishikawa D., Shindou H., Arai F., Kabe Y., Suematsu M., Shimizu T., Takubo K. « Environmental Optimization Enables Maintenance of Quiescent Hematopoietic Stem Cells Ex Vivo ». *Cell Rep.* [En ligne]. juillet 2019. Vol. 28, n°1, p. 145-158.e9. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.06.008 >

Koeffler H. P., Gasson J., Ranyard J., Souza L., Shepard M., Munker R. « Recombinant Human TNFαStimulates Production of Granulocyte Colony-Stimulating Factor ». *Blood* [En ligne]. 1 juillet 1987. Vol. 70, n°1, p. 55-59. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.V70.1.55.55 >

Korennykh A., Walter P. « Structural Basis of the Unfolded Protein Response ». *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* [En ligne]. 10 novembre 2012. Vol. 28, n°1, p. 251-277. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155826 >

Kornfeld R., Kornfeld S. « ASSEMBLY OF ASPARAGINE-LINKED OLIGOSACCHARIDES ». p. 34.

Koupenova M., Clancy L., Corkrey H. A., Freedman J. E. « Circulating Platelets as Mediators of Immunity, Inflammation and Thrombosis ». *Circ. Res.* [En ligne]. 19 janvier 2018. Vol. 122, n°2, p. 337-351. Disponible sur : < https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310795 >

Kubota Y., Takubo K., Suda T. « Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [En ligne]. 8 février 2008. Vol. 366, n°2, p. 335-339. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.086 >

Kuter D. J., Beeler D. L., Rosenberg R. D. « The purification of megapoietin: a physiological regulator of megakaryocyte growth and platelet production. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 8

novembre 1994. Vol. 91, n°23, p. 11104-11108.

Kwon M. S., Park C. S., Choi K., Park C.-S., Ahnn J., Kim J. I., Eom S. H., Kaufman S. J., Song W. K. « Calreticulin Couples Calcium Release and Calcium Influx in Integrin-mediated Calcium Signaling ». *Mol. Biol. Cell*. avril 2000. Vol. 11, n°4, p. 1433-1443.

Lee-Six H., Øbro N. F., Shepherd M. S., Grossmann S., Dawson K., Belmonte M., Osborne R. J., Huntly B. J. P., Martincorena I., Anderson E., O'Neill L., Stratton M. R., Laurenti E., Green A. R., Kent D. G., Campbell P. J. « Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations ». *Nature* [En ligne]. septembre 2018. Vol. 561, n°7724, p. 473-478. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41586-018-0497-0 >

Li J., Prins D., Park H. J., Grinfeld J., Gonzalez-Arias C., Loughran S., Dovey O. M., Klampfl T., Bennett C., Hamilton T. L., Pask D. C., Sneade R., Williams M., Aungier J., Ghevaert C., Vassiliou G. S., Kent D. G., Green A. R. « Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage ». *Blood* [En ligne]. 8 février 2018. Vol. 131, n°6, p. 649-661. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2017-09-806356 >

Liu L., Zhao M., Jin X., Ney G., Yang K. B., Peng F., Cao J., Iwawaki T., Del Valle J., Chen X., Li Q. « Adaptive endoplasmic reticulum stress signalling via IRE1α-XBP1 preserves self-renewal of haematopoietic and pre-leukaemic stem cells ». *Nat. Cell Biol.* [En ligne]. mars 2019. Vol. 21, n°3, p. 328-337. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41556-019-0285-6 >

Liu N., Fine R. E., Simons E., Johnson R. J. « Decreasing calreticulin expression lowers the Ca2+ response to bradykinin and increases sensitivity to ionomycin in NG-108-15 cells. » *J. Biol. Chem.* [En ligne]. novembre 1994. Vol. 269, n°46, p. 28635-28639. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61952-6 >

Liu P., Zhao L., Loos F., Marty C., Xie W., Martins I., Lachkar S., Qu B., Waeckel-Énée E., Plo I., Vainchenker W., Perez F., Rodriguez D., López-Otin C., Van Endert P., Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. « Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells ». *Mol. Cell* [En ligne]. février 2020. Vol. 77, n°4, p. 748-760.e9. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.11.004 >

Lu Y.-C., Weng W.-C., Lee H. « Functional Roles of Calreticulin in Cancer Biology ». *BioMed Res. Int.* [En ligne]. 2015. Vol. 2015, p. 1-9. Disponible sur : < https://doi.org/10.1155/2015/526524 >

Luchsinger L. L. « Hormetic ER Stress in Hematopoietic Stem Cells ». *Curr. Opin. Hematol.* [En ligne]. 1 novembre 2021. Vol. 28, n°6, p. 417-423. Disponible sur : < https://doi.org/10.1097/MOH.0000000000000668 >

Mansier O., Prouzet-Mauléon V., Jégou G., Barroso K., Raymundo D. P., Chauveau A., Dumas P.-Y., Lagarde V., Turcq B., Pasquet J.-M., Viallard J.-F., James C., Praloran V., Voutetakis K., Chatziioannou A., Mahon F.-X., Chevet E., Lippert E. « The Expression of Myeloproliferative Neoplasm-Associated Calreticulin Variants Depends on the Functionality of ER-Associated Degradation ». *Cancers* [En ligne]. 2 décembre 2019. Vol. 11, n°12, p. 1921. Disponible sur : < https://doi.org/10.3390/cancers11121921 >

Månsson R., Hultquist A., Luc S., Yang L., Anderson K., Kharazi S., Al-Hashmi S., Liuba K., Thorén L., Adolfsson J., Buza-Vidas N., Qian H., Soneji S., Enver T., Sigvardsson M., Jacobsen S. E. W. « Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors ». *Immunity* [En ligne]. avril 2007. Vol. 26, n°4, p. 407-419. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.013 >

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.* [En ligne]. 3 septembre 2002. Vol. 99, n°18, p. 11872-11877. Disponible sur : < https://doi.org/10.1073/pnas.172384399 >

Marty C., Pecquet C., Nivarthi H., El-Khoury M., Chachoua I., Tulliez M., Villeval J.-L., Raslova H., Kralovics R., Constantinescu S. N., Plo I., Vainchenker W. « Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis ». *Blood* [En ligne]. 10 mars 2016a. Vol. 127, n°10, p. 1317-1324. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679571 >

Marty C., Pecquet C., Nivarthi H., El-Khoury M., Chachoua I., Tulliez M., Villeval J.-L., Raslova H., Kralovics R., Constantinescu S. N., Plo I., Vainchenker W. « Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis ». *Blood* [En ligne]. 10 mars 2016b. Vol. 127, n°10, p. 1317-1324. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-679571 >

Masubuchi N., Araki M., Yang Y., Hayashi E., Imai M., Edahiro Y., Hironaka Y., Mizukami Y., Kihara Y., Takei H., Nudejima M., Koike M., Ohsaka A., Komatsu N. « Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface ». *Leukemia* [En ligne]. février 2020. Vol. 34, n°2, p. 499-509. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41375-019-0564-z >

Mazzi S., Lordier L., Debili N., Raslova H., Vainchenker W. « Megakaryocyte and polyploidization ». *Exp. Hematol.* [En ligne]. 1 janvier 2018. Vol. 57, p. 1-13. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.exphem.2017.10.001 >

McLemore M. L., Grewal S., Liu F., Archambault A., Poursine-Laurent J., Haug J., Link D. C. « STAT-3 Activation Is Required for Normal G-CSF-Dependent Proliferation and Granulocytic Differentiation ». *Immunity* [En ligne]. 1 février 2001. Vol. 14, n°2, p. 193-204. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00101-7 >

Mesaeli N., Nakamura K., Zvaritch E., Dickie P., Dziak E., Krause K. H., Opas M., MacLennan D. H., Michalak M. « Calreticulin is essential for cardiac development ». *J. Cell Biol.* [En ligne]. 8 mars 1999. Vol. 144, n°5, p. 857-868. Disponible sur : < https://doi.org/10.1083/jcb.144.5.857 >

Metcalf D. « The hemopoietic regulators – an embarrassment of riches ». *BioEssays* [En ligne]. 1992. Vol. 14, n°12, p. 799-805. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/bies.950141202 >

Michalak M., Groenendyk J., Szabo E., Gold L. I., Opas M. « Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum ». *Biochem. J.* [En ligne]. 1 février 2009. Vol. 417, n°3, p. 651-666. Disponible sur : < https://doi.org/10.1042/BJ20081847 >

Migliaccio A. R., Uversky V. N. « Dissecting physical structure of calreticulin, an intrinsically

disordered Ca2+-buffering chaperone from endoplasmic reticulum ». *J. Biomol. Struct. Dyn.* [En ligne]. mai 2018. Vol. 36, n°6, p. 1617-1636. Disponible sur : < https://doi.org/10.1080/07391102.2017.1330224 >

Miyakawa Y., Oda A., Druker B. J., Miyazaki H., Handa M., Ohashi H., Ikeda Y. « Thrombopoietin Induces Tyrosine Phosphorylation of Stat3 and Stat5 in Human Blood Platelets ». *Blood* [En ligne]. 15 janvier 1996. Vol. 87, n°2, p. 439-446. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.V87.2.439.bloodjournal872439 >

Monteferrario D., Bolar N. A., Marneth A. E., Hebeda K. M., Bergevoet S. M., Veenstra H., Laros-van Gorkom B. A. P., MacKenzie M. A., Khandanpour C., Botezatu L., Fransen E., Van Camp G., Duijnhouwer A. L., Salemink S., Willemsen B., Huls G., Preijers F., Van Heerde W., Jansen J. H., Kempers M. J. E., Loeys B. L., Van Laer L., Van der Reijden B. A. « A Dominant-Negative GFI1B Mutation in the Gray Platelet Syndrome ». *N. Engl. J. Med.* [En ligne]. 16 janvier 2014. Vol. 370, n°3, p. 245-253. Disponible sur : < https://doi.org/10.1056/NEJMoa1308130 >

Morita H., Tahara T., Matsumoto A., Kato T., Miyazaki H., Ohashi H. « Functional analysis of the cytoplasmic domain of the human Mpl receptor for tyrosine-phosphorylation of the signaling molecules, proliferation and differentiation ». 1996. p. 7.

Morita Y., Ema H., Nakauchi H. « Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment ». *J. Exp. Med.* [En ligne]. 7 juin 2010. Vol. 207, n°6, p. 1173-1182. Disponible sur : < https://doi.org/10.1084/jem.20091318 >

Morrison S. J., Spradling A. C. « Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life ». *Cell* [En ligne]. 22 février 2008. Vol. 132, n°4, p. 598-611. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038 >

Morrison S. J., Uchida N., Weissman I. L. « The Biology of Hematopoietic Stem Cells ». 1995. p. 37.

Mosca M., Hermange G., Tisserand A., Noble R., Marzac C., Marty C., Le Sueur C., Campario H., Vertenoeil G., El-Khoury M., Catelain C., Rameau P., Gella C., Lenglet J., Casadevall N., Favier R., Solary E., Cassinat B., Kiladjian J.-J., Constantinescu S. N., Pasquier F., Hochberg M. E., Raslova H., Villeval J.-L., Girodon F., Vainchenker W., Cournède P.-H., Plo I. « Inferring the dynamics of mutated hematopoietic stem and progenitor cells induced by IFNα in myeloproliferative neoplasms ». *Blood* [En ligne]. 2 décembre 2021. Vol. 138, n°22, p. 2231-2243. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.2021010986 >

Murone M., Carpenter D. A., De Sauvage F. J. « Hematopoietic Deficiencies in c-mpl and TPO Knockout Mice ». *STEM CELLS* [En ligne]. 1998. Vol. 16, n°1, p. 1-6. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/stem.160001 >

Nakamura K., Zuppini A., Arnaudeau S., Lynch J., Ahsan I., Krause R., Papp S., De Smedt H., Parys J. B., Muller-Esterl W., Lew D. P., Krause K. H., Demaurex N., Opas M., Michalak M. « Functional specialization of calreticulin domains ». *J. Cell Biol.* [En ligne]. 3 septembre 2001. Vol. 154, n°5, p. 961-972. Disponible sur : < https://doi.org/10.1083/jcb.200102073 >

Nakamura-Ishizu A., Ito K., Suda T. « Hematopoietic Stem Cell Metabolism during Development

and Aging ». *Dev. Cell* [En ligne]. 20 juillet 2020. Vol. 54, n°2, p. 239-255. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.06.029 >

Nam A. S., Kim K.-T., Chaligne R., Izzo F., Ang C., Taylor J., Myers R. M., Abu-Zeinah G., Brand R., Omans N. D., Alonso A., Sheridan C., Mariani M., Dai X., Harrington E., Pastore A., Cubillos-Ruiz J. R., Tam W., Hoffman R., Rabadan R., Scandura J. M., Abdel-Wahab O., Smibert P., Landau D. A. « Somatic mutations and cell identity linked by Genotyping of Transcriptomes ». *Nature* [En ligne]. 18 juillet 2019. Vol. 571, n°7765, p. 355-360. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41586-019-1367-0 >

Nangalia J., Massie C. E., Baxter E. J., Nice F. L., Gundem G., Wedge D. C., Avezov E., Li J., Kollmann K., Kent D. G., Aziz A., Godfrey A. L., Hinton J., Martincorena I., Van Loo P., Jones A. V., Guglielmelli P., Tarpey P., Harding H. P., Fitzpatrick J. D., Goudie C. T., Ortmann C. A., Loughran S. J., Raine K., Jones D. R., Butler A. P., Teague J. W., O'Meara S., McLaren S., Bianchi M., Silber Y., Dimitropoulou D., Bloxham D., Mudie L., Maddison M., Robinson B., Keohane C., Maclean C., Hill K., Orchard K., Tauro S., Du M.-Q., Greaves M., Bowen D., Huntly B. J. P., Harrison C. N., Cross N. C. P., Ron D., Vannucchi A. M., Papaemmanuil E., Campbell P. J., Green A. R. « Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2 ». *N. Engl. J. Med.* [En ligne]. 19 décembre 2013. Vol. 369, n°25, p. 2391-2405. Disponible sur : < https://doi.org/10.1056/NEJMoa1312542 >

Nauseef W. M., Borregaard N. « Neutrophils at work ». *Nat. Immunol.* [En ligne]. juillet 2014. Vol. 15, n°7, p. 602-611. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/ni.2921 >

Nauseef W. M., McCormick S. J., Clark R. A. « Calreticulin Functions as a Molecular Chaperone in the Biosynthesis of Myeloperoxidase (∗) ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 3 mars 1995. Vol. 270, n°9, p. 4741-4747. Disponible sur : < https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4741 >

Neubauer H., Cumano A., Müller M., Wu H., Huffstadt U., Pfeffer K. « Jak2 Deficiency Defines an EssentialDevelopmental Checkpoint in DefinitiveHematopoiesis ». *Cell* [En ligne]. 1 mai 1998. Vol. 93, n°3, p. 397-409. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81168-X >

Ng A. P., Kauppi M., Metcalf D., Hyland C. D., Josefsson E. C., Lebois M., Zhang J.-G., Baldwin T. M., Di Rago L., Hilton D. J., Alexander W. S. « Mpl expression on megakaryocytes and platelets is dispensable for thrombopoiesis but essential to prevent myeloproliferation ». *Proc. Natl. Acad. Sci.* [En ligne]. 22 avril 2014. Vol. 111, n°16, p. 5884-5889. Disponible sur : < https://doi.org/10.1073/pnas.1404354111 >

Nguyen T. K., Morse S. J., Fleischman A. G. « Transduction-Transplantation Mouse Model of Myeloproliferative Neoplasm ». *J. Vis. Exp.* [En ligne]. 22 décembre 2016. n°118, p. 54624. Disponible sur : < https://doi.org/10.3791/54624 >

Notta F., Zandi S., Takayama N., Dobson S., Gan O. I., Wilson G., Kaufmann K. B., McLeod J., Laurenti E., Dunant C. F., McPherson J. D., Stein L. D., Dror Y., Dick J. E. « Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny ». *Science* [En ligne]. 8 janvier 2016. Vol. 351, n°6269, p. aab2116. Disponible sur : < https://doi.org/10.1126/science.aab2116 >

Oakes S. A., Papa F. R. « The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology ». *Annu.*

Rev. Pathol. [En ligne]. 2015. Vol. 10, p. 173-194. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104649 >

Obeid M., Panaretakis T., Joza N., Tufi R., Tesniere A., Van Endert P., Zitvogel L., Kroemer G. « Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of γ-irradiation and UVC light-induced apoptosis ». *Cell Death Differ.* [En ligne]. octobre 2007. Vol. 14, n°10, p. 1848-1850. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402201 >

Oguro H. « The Roles of Cholesterol and Its Metabolites in Normal and Malignant Hematopoiesis ». *Front. Endocrinol.* [En ligne]. 2019. Vol. 10,. Disponible sur : < https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2019.00204 > (consulté le 24 septembre 2022)

Okada S., Nakauchi H., Nagayoshi K., Nishikawa S., Miura Y., Suda T. « In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells ». *Blood*. 15 décembre 1992. Vol. 80, n°12, p. 3044-3050.

Okamura K., Kimata Y., Higashio H., Tsuru A., Kohno K. « Dissociation of Kar2p/BiP from an ER Sensory Molecule, Ire1p, Triggers the Unfolded Protein Response in Yeast ». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [En ligne]. 20 décembre 2000. Vol. 279, n°2, p. 445-450. Disponible sur : < https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3987 >

Osman R., Tacnet-Delorme P., Kleman J.-P., Millet A., Frachet P. « Calreticulin Release at an Early Stage of Death Modulates the Clearance by Macrophages of Apoptotic Cells ». *Front. Immunol.* [En ligne]. 2017. Vol. 8,. Disponible sur : < https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.01034 > (consulté le 23 septembre 2022)

Pariser D. N., Hilt Z. T., Ture S. K., Blick-Nitko S. K., Looney M. R., Cleary S. J., Roman-Pagan E., Saunders J., Georas S. N., Veazey J., Madere F., Santos L. T., Arne A., Huynh N. P. T., Livada A. C., Guerrero-Martin S. M., Lyons C., Metcalf-Pate K. A., McGrath K. E., Palis J., Morrell C. N. « Lung megakaryocytes are immune modulatory cells ». *J. Clin. Invest.* [En ligne]. 4 janvier 2021. Vol. 131, n°1,. Disponible sur : < https://doi.org/10.1172/JCI137377 > (consulté le 23 septembre 2022)

Passamonti F., Elena C., Schnittger S., Skoda R. C., Green A. R., Girodon F., Kiladjian J.-J., McMullin M. F., Ruggeri M., Besses C., Vannucchi A. M., Lippert E., Gisslinger H., Rumi E., Lehmann T., Ortmann C. A., Pietra D., Pascutto C., Haferlach T., Cazzola M. « Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations ». *Blood* [En ligne]. 10 mars 2011. Vol. 117, n°10, p. 2813-2816. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-316810 >

Pecquet C., Chachoua I., Roy A., Balligand T., Vertenoeil G., Leroy E., Albu R.-I., Defour J.-P., Nivarthi H., Hug E., Xu E., Ould-Amer Y., Mouton C., Colau D., Vertommen D., Shwe M. M., Marty C., Plo I., Vainchenker W., Kralovics R., Constantinescu S. N. « Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants ». *Blood* [En ligne]. 20 juin 2019a. Vol. 133, n°25, p. 2669-2681. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874578 >

Pecquet C., Chachoua I., Roy A., Balligand T., Vertenoeil G., Leroy E., Albu R.-I., Defour J.-P., Nivarthi H., Hug E., Xu E., Ould-Amer Y., Mouton C., Colau D., Vertommen D., Shwe M. M., Marty C., Plo I., Vainchenker W., Kralovics R., Constantinescu S. N. « Calreticulin mutants as oncogenic rogue chaperones for TpoR and traffic-defective pathogenic TpoR mutants ». *Blood* [En ligne]. 20 juin 2019b. Vol. 133, n°25, p. 2669-2681. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2018-09-874578 >

Pietra D., Li S., Brisci A., Passamonti F., Rumi E., Theocharides A., Ferrari M., Gisslinger H., Kralovics R., Cremonesi L., Skoda R., Cazzola M. « Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders ». *Blood* [En ligne]. 1 février 2008. Vol. 111, n°3, p. 1686-1689. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-101576 >

Pietra D., Rumi E., Ferretti V. V., Buduo C. A. D., Milanesi C., Cavalloni C., Sant'Antonio E., Abbonante V., Moccia F., Casetti I. C., Bellini M., Renna M. C., Roncoroni E., Fugazza E., Astori C., Boveri E., Rosti V., Barosi G., Balduini A., Cazzola M. « Differential clinical effects of different mutation subtypes in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms ». *Leukemia* [En ligne]. février 2016. Vol. 30, n°2, p. 431-438. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/leu.2015.277 >

Pikman Y., Lee B. H., Mercher T., McDowell E., Ebert B. L., Gozo M., Cuker A., Wernig G., Moore S., Galinsky I., DeAngelo D. J., Clark J. J., Lee S. J., Golub T. R., Wadleigh M., Gilliland D. G., Levine R. L. « MPLW515L Is a Novel Somatic Activating Mutation in Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia ». *PLOS Med.* [En ligne]. 18 juillet 2006. Vol. 3, n°7, p. e270. Disponible sur : < https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030270 >

Pinho S., Marchand T., Yang E., Wei Q., Nerlov C., Frenette P. S. « Lineage-biased hematopoietic stem cells are regulated by distinct niches ». *Dev. Cell* [En ligne]. 12 mars 2018. Vol. 44, n°5, p. 634-641.e4. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.01.016 >

Prins D., Groenendyk J., Touret N., Michalak M. « Modulation of STIM1 and capacitative Ca2+ entry by the endoplasmic reticulum luminal oxidoreductase ERp57 ». *EMBO Rep.* [En ligne]. novembre 2011. Vol. 12, n°11, p. 1182-1188. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/embor.2011.173 >

Prins D., Park H. J., Watcham S., Li J., Vacca M., Bastos H. P., Gerbaulet A., Vidal-Puig A., Göttgens B., Green A. R. « The stem/progenitor landscape is reshaped in a mouse model of essential thrombocythemia and causes excess megakaryocyte production ». *Sci. Adv.* [En ligne]. 25 novembre 2020. Vol. 6, n°48, p. eabd3139. Disponible sur : < https://doi.org/10.1126/sciadv.abd3139 >

Prins M. H., Lensing A. W. A., Prandoni P., Wells P. S., Verhamme P., Beyer-Westendorf J., Bauersachs R., Bounameaux H., Brighton T. A., Cohen A. T., Davidson B. L., Decousus H., Kakkar A. K., Van Bellen B., Pap A. F., Homering M., Tamm M., Weitz J. I. « Risk of recurrent venous thromboembolism according to baseline risk factor profiles ». *Blood Adv.* [En ligne]. 10 avril 2018. Vol. 2, n°7, p. 788-796. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018017160 >

Pronier E., Cifani P., Merlinsky T. R., Berman K. B., Somasundara A. V. H., Rampal R. K., LaCava J.,

Wei K. E., Pastore F., Maag J. L. V., Park J., Koche R., Kentsis A., Levine R. L. « Targeting the CALR interactome in myeloproliferative neoplasms ». *JCI Insight* [En ligne]. 15 novembre 2018. Vol. 3, n°22, p. e122703. Disponible sur : < https://doi.org/10.1172/jci.insight.122703 >

Psaila B., Wang G., Rodriguez-Meira A., Li R., Heuston E. F., Murphy L., Yee D., Hitchcock I. S., Sousos N., O'Sullivan J., Anderson S., Senis Y. A., Weinberg O. K., Calicchio M. L., Iskander D., Royston D., Milojkovic D., Roberts I., Bodine D. M., Thongjuea S., Mead A. J. « Single-Cell Analyses Reveal Megakaryocyte-Biased Hematopoiesis in Myelofibrosis and Identify Mutant Clone-Specific Targets ». *Mol. Cell* [En ligne]. 7 mai 2020. Vol. 78, n°3, p. 477-492.e8. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.04.008 >

Rojnuckarin P., Drachman J. G., Kaushansky K. « Thrombopoietin-Induced Activation of the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Pathway in Normal Megakaryocytes: Role in Endomitosis ». *Blood* [En ligne]. 15 août 1999. Vol. 94, n°4, p. 1273-1282. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.V94.4.1273 >

Rollison D. E., Howlader N., Smith M. T., Strom S. S., Merritt W. D., Ries L. A., Edwards B. K., List A. F. « Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs ». *Blood* [En ligne]. 1 juillet 2008. Vol. 112, n°1, p. 45-52. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2008-01-134858 >

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.* [En ligne]. 22 juillet 2005. Vol. 280, n°29, p. 27251-27261. Disponible sur : < https://doi.org/10.1074/jbc.M501376200 >

Ruggiano A., Foresti O., Carvalho P. « ER-associated degradation: Protein quality control and beyond ». *J. Cell Biol.* [En ligne]. 17 mars 2014. Vol. 204, n°6, p. 869-879. Disponible sur : < https://doi.org/10.1083/jcb.201312042 >

Russell D. W. « The Enzymes, Regulation, and Genetics of Bile Acid Synthesis ». *Annu. Rev. Biochem.* [En ligne]. juin 2003. Vol. 72, n°1, p. 137-174. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161712 >

Saharinen P., Silvennoinen O. « The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction ». *J. Biol. Chem.* [En ligne]. 6 décembre 2002. Vol. 277, n°49, p. 47954-47963. Disponible sur : < https://doi.org/10.1074/jbc.M205156200 >

Salati S., Prudente Z., Genovese E., Pennucci V., Rontauroli S., Bartalucci N., Mannarelli C., Ruberti S., Zini R., Rossi C., Bianchi E., Guglielmelli P., Tagliafico E., Vannucchi A. M., Manfredini R., On behalf of the AGIMM (AIRC Gruppo. « Calreticulin Affects Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Fate by Impacting Erythroid and Megakaryocytic Differentiation ». *Stem Cells Dev.* [En ligne]. 15 février 2018. Vol. 27, n°4, p. 225-236. Disponible sur : < https://doi.org/10.1089/scd.2017.0137 >

Sanjuan-Pla A., Macaulay I. C., Jensen C. T., Woll P. S., Luis T. C., Mead A., Moore S., Carella C., Matsuoka S., Jones T. B., Chowdhury O., Stenson L., Lutteropp M., Green J. C. A., Facchini R.,

Boukarabila H., Grover A., Gambardella A., Thongjuea S., Carrelha J., Tarrant P., Atkinson D., Clark S.-A., Nerlov C., Jacobsen S. E. W. « Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy ». *Nature* [En ligne]. octobre 2013. Vol. 502, n°7470, p. 232-236. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/nature12495 >

Sattler M., Durstin M. A., Frank D. A., Okuda K., Kaushansky K., Salgia R., Griffin J. D. « The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases ». *Exp. Hematol.* août 1995. Vol. 23, n°9, p. 1040-1048.

Saur S. J., Sangkhae V., Geddis A. E., Kaushansky K., Hitchcock I. S. « Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl ». *Blood* [En ligne]. 11 février 2010. Vol. 115, n°6, p. 1254-1263. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-227033 >

De Sauvage F. J., Hass P. E., Spencer S. D., Malloy B. E., Gurney A. L., Spencer S. A., Darbonne W. C., Henzel W. J., Wong S. C., Kuang W. J. « Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand ». *Nature* [En ligne]. 16 juin 1994. Vol. 369, n°6481, p. 533-538. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/369533a0 >

Schischlik F., Jäger R., Rosebrock F., Hug E., Schuster M., Holly R., Fuchs E., Milosevic Feenstra J. D., Bogner E., Gisslinger B., Schalling M., Rumi E., Pietra D., Fischer G., Faé I., Vulliard L., Menche J., Haferlach T., Meggendorfer M., Stengel A., Bock C., Cazzola M., Gisslinger H., Kralovics R. « Mutational landscape of the transcriptome offers putative targets for immunotherapy of myeloproliferative neoplasms ». *Blood* [En ligne]. 11 juillet 2019. Vol. 134, n°2, p. 199-210. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.2019000519 >

Schröder M., Kaufman R. J. « The mammalian unfolded protein response ». *Annu. Rev. Biochem.* [En ligne]. 2005. Vol. 74, p. 739-789. Disponible sur : < https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134 >

Scott L. M., Scott M. A., Stratton M. R., Erber W. N., Harrison C. N., Gilliland D. G., Green A. R., Path F. R. C. « JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis ». *N. Engl. J. Med.* 2007. p. 10.

Secardin L., Gomez Limia C., Da Silva-Benedito S., Lordier L., El-Khoury M., Marty C., Ianotto J.-C., Raslova H., Constantinescu S. N., Bonamino M. H., Vainchenker W., Monte-Mor B., Di Stefano A., Plo I. « Induced Pluripotent Stem Cells Enable Disease Modeling and Drug Screening in Calreticulin del52 and ins5 Myeloproliferative Neoplasms ». *HemaSphere* [En ligne]. 12 juin 2021. Vol. 5, n°7, p. e593. Disponible sur : < https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000593 >

Semple J. « PLATELETS AND THE IMMUNE CONTINUUM ». *Vox Sang.* 1 juillet 2012. Vol. 103, p. 61-61.

Shao L., Li H., Pazhanisamy S. K., Meng A., Wang Y., Zhou D. « Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence ». *Int. J. Hematol.* [En ligne]. juillet 2011. Vol. 94, n°1, p. 24-32. Disponible sur : < https://doi.org/10.1007/s12185-011-0872-1 >

Shide K., Kameda T., Kamiunten A., Oji A., Ozono Y., Sekine M., Honda A., Kitanaka A., Akizuki K., Tahira Y., Nakamura K., Hidaka T., Kubuki Y., Abe H., Miike T., Iwakiri H., Tahara Y., Sueta M.,

Hasuike S., Yamamoto S., Nagata K., Ikawa M., Shimoda K. « Mice with Calr mutations homologous to human CALR mutations only exhibit mild thrombocytosis ». *Blood Cancer J.* [En ligne]. avril 2019. Vol. 9, n°4, p. 42. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41408-019-0202-z >

Shide K., Kameda T., Yamaji T., Sekine M., Inada N., Kamiunten A., Akizuki K., Nakamura K., Hidaka T., Kubuki Y., Shimoda H., Kitanaka A., Honda A., Sawaguchi A., Abe H., Miike T., Iwakiri H., Tahara Y., Sueta M., Hasuike S., Yamamoto S., Nagata K., Shimoda K. « Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib ». *Leukemia* [En ligne]. mai 2017. Vol. 31, n°5, p. 1136-1144. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/leu.2016.308 >

Sirhan S., Busque L., Foltz L., Grewal K., Hamm C., Laferriere N., Laneuville P., Leber B., Liew E., Olney H., Prchal J., Porwit A., Gupta V. « Evolving Therapeutic Options for Polycythemia Vera: Perspectives of the Canadian Myeloproliferative Neoplasms (MPN) Group ». *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* [En ligne]. 1 août 2015. Vol. 15,. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.clml.2015.07.650 >

Smith M. J., Koch G. L. « Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. » *EMBO J.* 1 décembre 1989. Vol. 8, n°12, p. 3581-3586.

Staerk J., Lacout C., Sato T., Smith S. O., Vainchenker W., Constantinescu S. N. « An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor ». *Blood* [En ligne]. 1 mars 2006. Vol. 107, n°5, p. 1864-1871. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2600 >

Stanley R. F., Steidl U. « Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation ». *Cancer Discov.* [En ligne]. avril 2016. Vol. 6, n°4, p. 344-346. Disponible sur : < https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0238 >

Sun S., Jin C., Si J., Lei Y., Chen K., Cui Y., Liu Z., Liu J., Zhao M., Zhang X., Tang F., Rondina M. T., Li Y., Wang Q. « Single-cell analysis of ploidy and the transcriptome reveals functional and spatial divergency in murine megakaryopoiesis ». *Blood* [En ligne]. 7 octobre 2021. Vol. 138, n°14, p. 1211-1224. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.2021010697 >

Takubo K., Goda N., Yamada W., Iriuchishima H., Ikeda E., Kubota Y., Shima H., Johnson R. S., Hirao A., Suematsu M., Suda T. « Regulation of the HIF-1α Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. septembre 2010. Vol. 7, n°3, p. 391-402. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.06.020 >

Tefferi A., Barbui T. « Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management ». *Am. J. Hematol.* [En ligne]. février 2015. Vol. 90, n°2, p. 162-173. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/ajh.23895 >

Tefferi A., Cervantes F., Mesa R., Passamonti F., Verstovsek S., Vannucchi A. M., Gotlib J., Dupriez B., Pardanani A., Harrison C., Hoffman R., Gisslinger H., Kröger N., Thiele J., Barbui T., Barosi G. « Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European

LeukemiaNet (ELN) consensus report ». *Blood* [En ligne]. 22 août 2013. Vol. 122, n°8, p. 1395-1398. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2013-03-488098 >

Tefferi A., Nicolosi M., Mudireddy M., Szuber N., Finke C. M., Lasho T. L., Hanson C. A., Ketterling R. P., Pardanani A., Gangat N., Mannarelli C., Fanelli T., Guglielmelli P., Vannucchi A. M. « Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients ». *Am. J. Hematol.* [En ligne]. 2018. Vol. 93, n°3, p. 348-355. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/ajh.24978 >

Tefferi A., Wassie E. A., Guglielmelli P., Gangat N., Belachew A. A., Lasho T. L., Finke C., Ketterling R. P., Hanson C. A., Pardanani A., Wolanskyj A. P., Maffioli M., Casalone R., Pacilli A., Vannucchi A. M., Passamonti F. « Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients: Type 1 vs. type 2 CALR Mutations in ET ». *Am. J. Hematol.* [En ligne]. août 2014. Vol. 89, n°8, p. E121-E124. Disponible sur : < https://doi.org/10.1002/ajh.23743 >

Tijssen M. R., Cvejic A., Joshi A., Hannah R. L., Ferreira R., Forrai A., Bellissimo D. C., Oram S. H., Smethurst P. A., Wilson N. K., Wang X., Ottersbach K., Stemple D. L., Green A. R., Ouwehand W. H., Göttgens B. « Genome-wide Analysis of Simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL Binding in Megakaryocytes Identifies Hematopoietic Regulators ». *Dev. Cell* [En ligne]. 17 mai 2011. Vol. 20, n°5, p. 597-609. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.04.008 >

Tong W., Lodish H. F. « Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis ». *J. Exp. Med.* [En ligne]. 6 septembre 2004. Vol. 200, n°5, p. 569-580. Disponible sur : < https://doi.org/10.1084/jem.20040762 >

Tonkin J., Francis Y., Pattinson A., Peters T., Taylor M., Thompson R., Wallis L. « Myeloproliferative neoplasms: diagnosis, management and treatment ». *Nurs. Stand. R. Coll. Nurs. G. B. 1987* [En ligne]. 22 août 2012. Vol. 26, n°51, p. 44-51. Disponible sur : < https://doi.org/10.7748/ns2012.08.26.51.44.c9243 >

Toppaldoddi K. R., Da Costa Cacemiro M., Bluteau O., Panneau-Schmaltz B., Pioch A., Muller D., Villeval J.-L., Raslova H., Constantinescu S. N., Plo I., Vainchenker W., Marty C. « Rare type 1-like and type 2-like calreticulin mutants induce similar myeloproliferative neoplasms as prevalent type 1 and 2 mutants in mice ». *Oncogene* [En ligne]. mars 2019. Vol. 38, n°10, p. 1651-1660. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41388-018-0538-z >

Tubman V. N., Levine J. E., Campagna D. R., Monahan-Earley R., Dvorak A. M., Neufeld E. J., Fleming M. D. « X-linked gray platelet syndrome due to a GATA1 Arg216Gln mutation ». *Blood* [En ligne]. 5 janvier 2007. Vol. 109, n°8, p. 3297-3299. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-004101 >

Tvorogov D., Thompson-Peach C. A. L., Foßelteder J., Dottore M., Stomski F., Onnesha S. A., Lim K., Moretti P. A. B., Pitson S. M., Ross D. M., Reinisch A., Thomas D., Lopez A. F. « Targeting human CALR-mutated MPN progenitors with a neoepitope-directed monoclonal antibody ». *EMBO Rep.* [En ligne]. 5 avril 2022. Vol. 23, n°4, p. e52904. Disponible sur : < https://doi.org/10.15252/embr.202152904 >

Vainchenker W., Besancenot R., Favale F. « [Megakaryopoiesis: regulation of platelet production by thrombopoietin] ». *Bull. Acad. Natl. Med.* février 2013. Vol. 197, n°2, p. 395-406.

Velten L., Haas S. F., Raffel S., Blaszkiewicz S., Islam S., Hennig B. P., Hirche C., Lutz C., Buss E. C., Nowak D., Boch T., Hofmann W.-K., Ho A. D., Huber W., Trumpp A., Essers M. A. G., Steinmetz L. M. « Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process ». *Nat. Cell Biol.* [En ligne]. avril 2017. Vol. 19, n°4, p. 271-281. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/ncb3493 >

Vigon I., Mornon J. P., Cocault L., Mitjavila M. T., Tambourin P., Gisselbrecht S., Souyri M. « Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. » *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 15 juin 1992. Vol. 89, n°12, p. 5640-5644.

Wang W.-A., Liu W.-X., Durnaoglu S., Lee S.-K., Lian J., Lehner R., Ahnn J., Agellon L. B., Michalak M. « Loss of Calreticulin Uncovers a Critical Role for Calcium in Regulating Cellular Lipid Homeostasis ». *Sci. Rep.* [En ligne]. décembre 2017. Vol. 7, n°1, p. 5941. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/s41598-017-05734-x >

Weissman I. L., Shizuru J. A. « The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases ». *Blood* [En ligne]. 1 novembre 2008. Vol. 112, n°9, p. 3543-3553. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-078220 >

Westerterp M., Gourion-Arsiquaud S., Murphy A. J., Shih A., Cremers S., Levine R. L., Tall A. R., Yvan-Charvet L. « Regulation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mobilization by Cholesterol Efflux Pathways ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. août 2012. Vol. 11, n°2, p. 195-206. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.024 >

Williams D. M., Kim A. H., Rogers O., Spivak J. L., Moliterno A. R. « Phenotypic variations and new mutations in JAK2 V617F–negative polycythemia vera, erythrocytosis, and idiopathic myelofibrosis ». *Exp. Hematol.* [En ligne]. 1 novembre 2007. Vol. 35, n°11, p. 1641-1646. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.08.010 >

Wolanskyj M. A. P., Schwager C. S. M., Mcclure M. R. F., Larson M. D. R., ;, Tefferi And M. A. « Essential thrombocythemia beyond the first decade: life expectancy, long-term complication rates, and prognostic factors ». In : *Mayo Clin. Proc.* [s.l.] : [s.n.], 2006. p. 159-166.

Xu S., Di Z., He Y., Wang R., Ma Y., Sun R., Li J., Wang T., Shen Yujun, Fang S., Feng L., Shen Yuxian. « Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) protects against Aβ toxicity via attenuating Aβ-induced endoplasmic reticulum stress ». *J. Neuroinflammation* [En ligne]. 13 février 2019. Vol. 16, n°1, p. 35. Disponible sur : < https://doi.org/10.1186/s12974-019-1429-0 >

Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Holt V. E., Silvennoinen O., O'Shea J. J. « The Janus kinases (Jaks) ». *Genome Biol.* [En ligne]. 30 novembre 2004. Vol. 5, n°12, p. 253. Disponible sur : < https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-12-253 >

Yang L., Bryder D., Adolfsson J., Nygren J., Månsson R., Sigvardsson M., Jacobsen S. E. W. « Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients ». *Blood* [En ligne]. 1 avril 2005. Vol. 105, n°7, p. 2717-2723. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood-2004-06-2159 >

Yeung A. K., Villacorta-Martin C., Hon S., Rock J. R., Murphy G. J. « Lung megakaryocytes display distinct transcriptional and phenotypic properties ». *Blood Adv.* [En ligne]. 15 décembre 2020. Vol. 4, n°24, p. 6204-6217. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002843 >

Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K. « XBP1 mRNA Is Induced by ATF6 and Spliced by IRE1 in Response to ER Stress to Produce a Highly Active Transcription Factor ». *Cell* [En ligne]. 28 décembre 2001. Vol. 107, n°7, p. 881-891. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00611-0 >

Yoshihara H., Arai F., Hosokawa K., Hagiwara T., Takubo K., Nakamura Y., Gomei Y., Iwasaki H., Matsuoka S., Miyamoto K., Miyazaki H., Takahashi T., Suda T. « Thrombopoietin/MPL Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence and Interaction with the Osteoblastic Niche ». *Cell Stem Cell* [En ligne]. 13 décembre 2007. Vol. 1, n°6, p. 685-697. Disponible sur : < https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.10.020 >

Zhang M. Y., Churpek J. E., Keel S. B., Walsh T., Lee M. K., Loeb K. R., Gulsuner S., Pritchard C. C., Sanchez-Bonilla M., Delrow J. J., Basom R. S., Forouhar M., Gyurkocza B., Schwartz B. S., Neistadt B., Marquez R., Mariani C. J., Coats S. A., Hofmann I., Lindsley R. C., Williams D. A., Abkowitz J. L., Horwitz M. S., King M.-C., Godley L. A., Shimamura A. « Germline ETV6 mutations in familial thrombocytopenia and hematologic malignancy ». *Nat. Genet.* [En ligne]. février 2015. Vol. 47, n°2, p. 180-185. Disponible sur : < https://doi.org/10.1038/ng.3177 >

Zsebo K. M., Yuschenkoff V. N., Schiffer S., Chang D., McCall E., Dinarello C. A., A. M., Altrock. B., Bagby. Jr G. C. « Vascular Endothelial Cells and Granulopoiesis: Interleukin-1 Stimulates Release of G-CSF and GM-CSF ». *Blood* [En ligne]. 1 janvier 1988. Vol. 71, n°1, p. 99-103. Disponible sur : < https://doi.org/10.1182/blood.V71.1.99.99 >

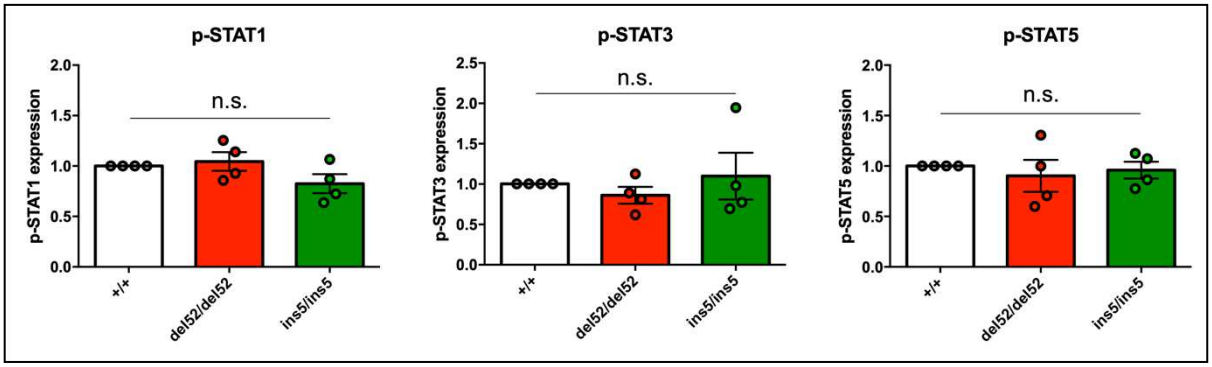


Figure 24 Niveau d'expression des p-STAT par CytTOF.

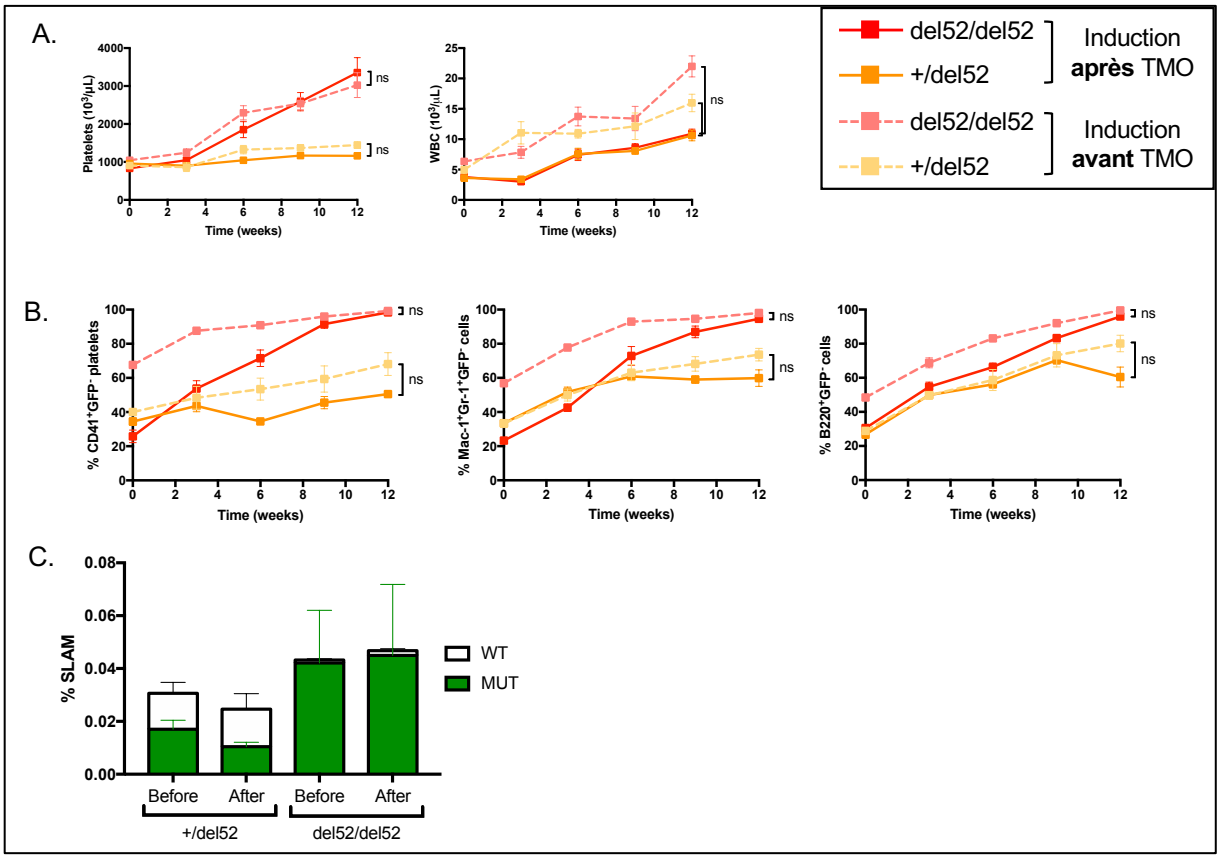


Figure 25 Greffe compétitive de cellules induites avant ou après greffe. A. Paramètres sanguins suivis toutes les 3 semaines (n=7) sur un analyseur hématologique Mellet Schloessing 9 (MS9). B. Suivi des cellules mutées par cytométrie des populations de plaquettes (CD41+GFP-), granuleux (Mac1+Gr1+GFP-) et lymphocytes B (B220+GFP-). C. Pourcentage de CSH (Lin-cKit+Sca-1+CD48-CD150+) à 4 mois post greffe.

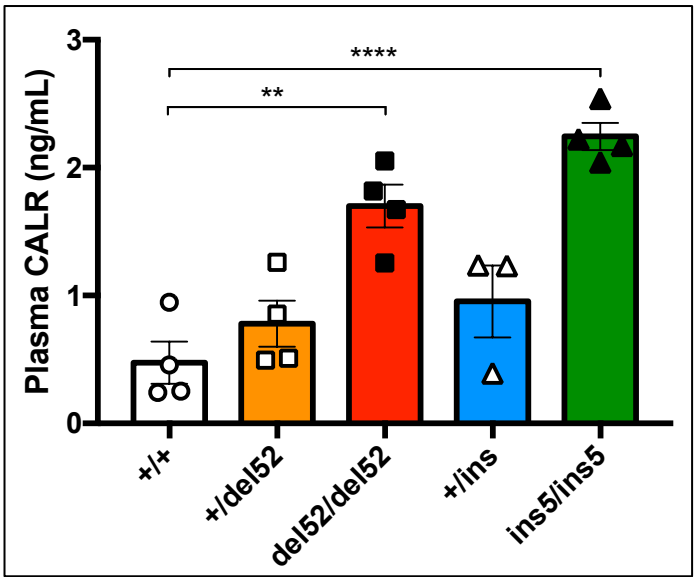
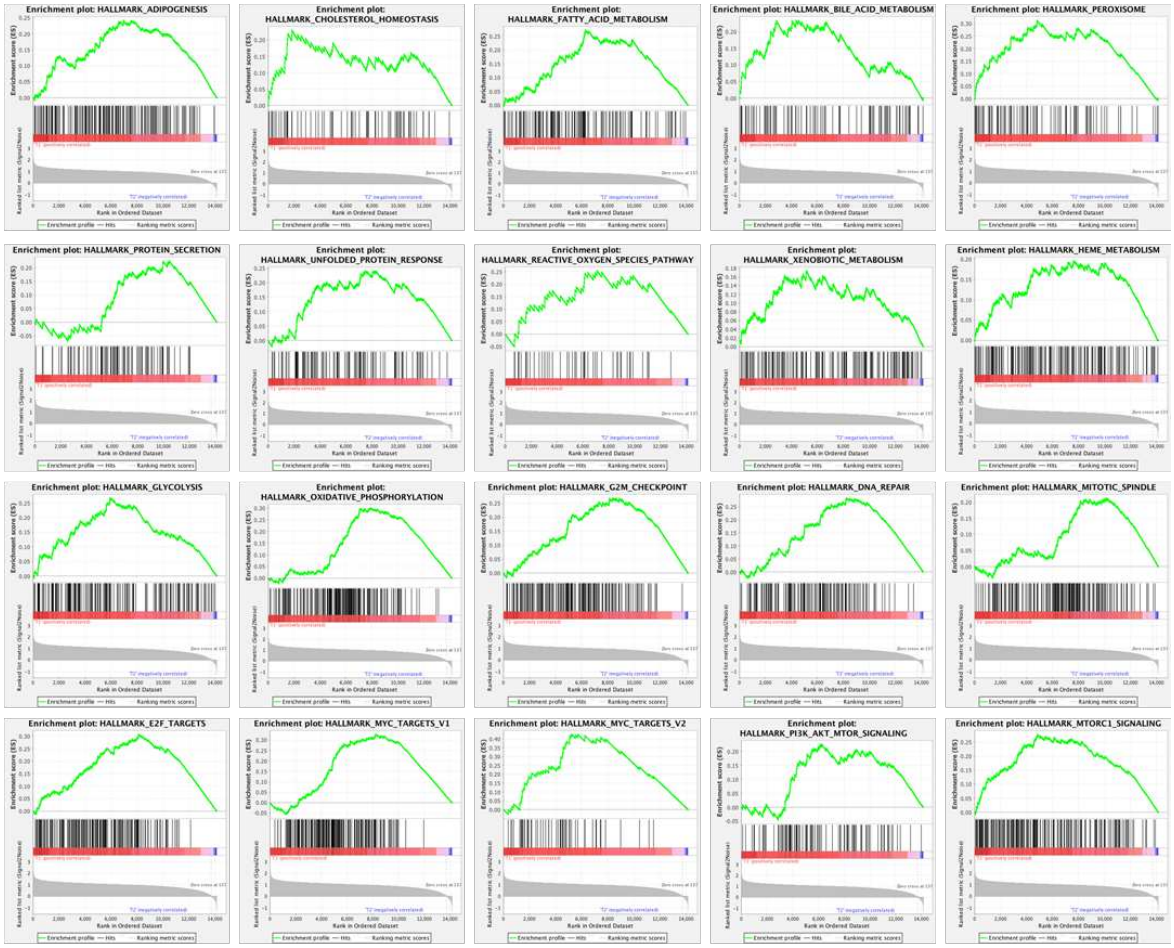


Figure 26 Mesure de la concentration de CALR plasmatique par ELISA. Test ANOVA multicomparaisons a été réalisé *p.value<0,05

Enrichment in *del52/del52* SLAM phenotype



Enrichment in *ins5/ins5* SLAM phenotype

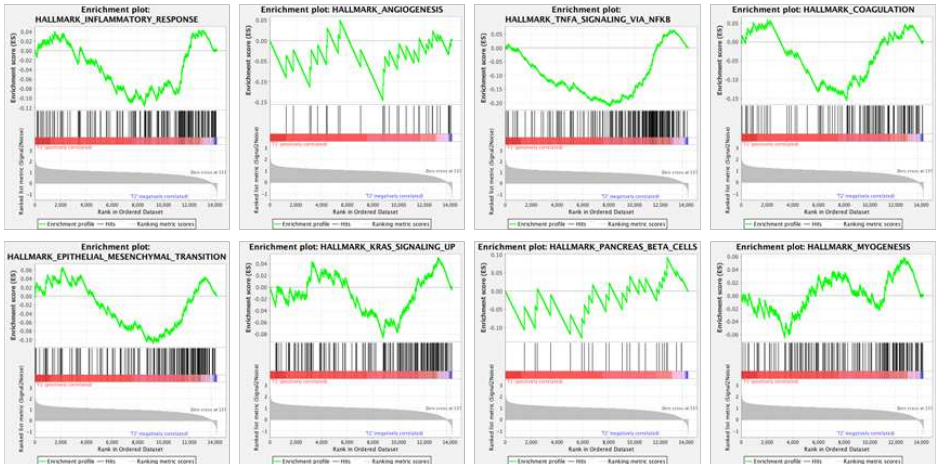


Figure 27 Voies enrichies par les CALRmut par RNAseq.