UNIVERSITÉ DE NANTES
UFR SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

ANNÉE 2021 **N°** 2021-213
(complété par la scolarité)

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu devant le jury interrégional

Le 8 novembre 2021

Par Clélia MORNET

Conformément aux dispositions du Décret n° 2012-172 du 3 février

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Dérégulation transcriptionnelle et de l'épissage dans les néoplasies myéloprolifératives

---

Présidente : **Mme Edith Bigot-Corbel,** Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier (Habilitation à Diriger des Recherches) de Biochimie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

Directeur de thèse : M. Eric Lippert, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier d'Hématologie, UFR de Médecine de Brest

Membres du jury : M. Hubert Galinat, Praticien Hospitalier, CHU de Brest
M. Cédric Le Maréchal, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier de Génétique, UFR de Médecine de Brest

Remerciements

A Madame Edith Bigot Corbel,
Merci d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et de juger mon travail.
Merci pour vos enseignements lorsque j'étais étudiante, ils m'ont donné envie de poursuivre dans cette voie.

A Monsieur Eric Lippert,
Merci de m'avoir proposé ce sujet et encadrée lors de ce travail.
Merci pour votre implication au cours de tous ces semestres d'internat au sein du laboratoire d'hématologie, j'ai énormément appris grâce à vous.
Merci pour votre compréhension bienveillante quant à mes choix professionnels.

A Monsieur Cédric Le Maréchal,
Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.
Merci de m'avoir accueillie au sein du service de génétique à mon retour d'année-recherche.
Merci pour votre écoute et pour le dialogue quant à la suite de mon parcours.

A Monsieur Hubert Galinat,
Hubert, merci pour tout ! Sans toi je ne serai probablement pas biologiste. Depuis mon premier semestre à Brest tu as été d'un soutien total dans les moments compliqués. Merci de rendre ta discipline aussi passionnante, et de m'avoir donné envie de faire de l'hémostase. Merci pour tous les à-côtés, notamment les discussions jardinage, psychologie, les cafés-cannelés, et tout le reste.

A Marie,
Merci pour ton implication dans cette thèse. Merci pour ta disponibilité et tes explications, tu as été d'une aide précieuse. Je suis très heureuse d'avoir eu l'occasion de travailler avec toi et je te souhaite le meilleur pour la suite.

A Audrey,
Merci d'avoir été là en cette fin d'internat. Merci pour ton écoute et tes conseils. Mon passage en cytogénétique m'a permis, outre de m'amuser avec les chromosomes, de te connaitre et j'en suis ravie. J'ai hâte de continuer à partager ma passion jeux avec toi.

A Fanny,
Merci pour ton accueil, ta bienveillance et ta gentillesse lors de ses semestres. Ton sens pratique et de l'organisation permet aux internes de se sentir accompagnés. Ton honnêteté est un vent de fraicheur pour moi.

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie de Brest,
Merci pour tout ce que vous m'avez appris lors de ce long passage chez vous, dans une ambiance de travail sérieuse et accueillante.

A Marilou et Victor,

Merci d'avoir été compréhensifs avec moi lors de ces six mois lorsque j'étais occupée avec cette thèse d'exercice. Je vous souhaite d'avoir des co-internes aussi sympas lorsque ce sera votre tour.

Aux internes que j'ai côtoyés pendant ces quatre années et notamment,

Les Nantais : Charles, meilleur co-interne à jamais, la suite de l'internat a été moins drôle sans toi ; évidemment ceux du semestre particulier de bactério, Adeline, Clémence, Charles (encore toi), Thomas et Pierre ; Gauthier, soutien pendant le semestre de biochimie et après ; et Emeline.

Les Brestois de l'ancien temps : Clément, pour ton rire inimitable ; Claire et Simon, pour nos après-midi jeux à essayer de résoudre les énigmes dans le temps imparti sans oublier de cartes !

A Sara,

Si le semestre à l'internat a été une période incroyable c'est notamment grâce à toi ! Merci pour ta bonne humeur, ton entrain pour aller au cinéma les yeux fermés, pour des chefs d'œuvre comme pour des moins chefs d'œuvre. Merci à toi et à tes parents de m'avoir permis d'envisager ma courte période parisienne sereinement.

A l'équipe 1034 de Bordeaux et notamment,

Chloé et Olivier : merci pour votre encadrement, cela a été un plaisir de travailler avec vous. Et Chloé, merci de m'avoir fait découvrir le Pilates, j'essaie de m'y tenir même maintenant de retour en Bretagne.

Harmony : partager cette année-recherche avec toi a permis d'éloigner un petit peu le Covid. Certaines situations avec nos amies à quatre pattes auraient été bien plus compliquées si tu n'avais pas été là ! Merci pour toutes tes petites attentions qui m'ont beaucoup touchée.

Lauriane : beaucoup de choses nous ont rapprochées lors de cette année, les jeux comme les recherches d'appartement ! Sans oublier tes talents de pâtisserie.

Maxime : tu as été un élément central de ma période bordelaise ! Grâce à nos sessions jeux l'année est passée très rapidement, peut-être trop car la Brute et la Crapule n'ont pas pu finir leurs missions.

A mes amis de fac,

En premier lieu Christopher, binôme de toujours, sans qui toutes ces années de fac auraient été bien différentes. Merci pour ta joie de vivre communicative, ta légèreté qui parvenait à contrebalancer mon stress.

Pauline : merci beaucoup pour tes conseils en cette fin d'internat, cela m'a rassurée et confortée dans mon choix. Je suis très heureuse que, bien qu'à distance, nous soyons désormais collègues.

Julia : merci de m'avoir accueillie lors de mes escapades lyonnaises.

A mes parents,

Merci pour votre amour, votre compréhension, votre soutien constant tout au long de ces années. Merci de n'avoir jamais douté quand pour moi c'était moins évident.

Merci d'être là tout simplement.

Avant-propos

Dans ce document je présente mon travail de thèse d'exercice, travail réalisé avec l'équipe du Pr. LIPPERT, au sein de l'axe Epissage-Cancérologie-Lipides-Apoptose dirigé par le Dr. CORCOS dans l'unité Inserm UMR 1078 sous la direction du Dr. GENIN.

Ce travail s'intègre dans un projet plus global qui étudie les différentes perturbations observées au décours de l'évolution des néoplasies myéloprolifératives et notamment les modifications de l'épissage. Pour ce faire, l'équipe a mis au point un modèle cellulaire double muté *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q. Les cellules utilisées sont issues de la lignée cellulaire UT-7, une lignée leucémique humaine dépendante des cytokines pour sa prolifération et sa survie, capable de se différencier vers la lignée érythroïde ou mégacaryocytaire. Ces cellules ont été transduites à l'aide de vecteurs lentiviraux avec un promoteur inductible à la tétracycline, permettant aux cellules d'exprimer de façon contrôlée la mutation canonique $JAK2^{V617F}$ et/ou une mutation additionnelle : $IDH2^{R140Q}$; ou bien leurs homologues sauvages. De plus, les plasmides contenant le gène *JAK2* sauvage ou muté conféraient aux cellules une résistance à la puromycine, tandis que les plasmides contenant le gène *IDH2* sauvage ou muté conféraient aux cellules une résistance à l'hygromycine B, permettant de sélectionner les cellules ayant intégré les plasmides. Des analyses RNA-seq après une expression transgénique de 7 ou 14 jours de *JAK2* et *IDH2* sauvages ou mutants ont révélé une expression et/ou un épissage différentiel de différentes cibles. Ces cibles d'épissage et d'expression ont été confirmées par RT-(q)PCR dans la lignée cellulaire.

Mon objectif plus précis dans le cadre de cette thèse d'exercice, a été de valider ces évènements observés dans le modèle dans des cellules primaires de patients atteints de néoplasies myéloprolifératives. Dans un premier temps je vais réintroduire les notions de néoplasies myéloprolifératives, d'épigénétique et d'épissage. Par la suite, je décris plus en détail les différents évènements étudiés dans ce travail pour ensuite présenter les résultats obtenus. Ce document s'achève avec une discussion des résultats puis une conclusion de ce travail.

Sommaire

Avant-propos 4
Liste des abréviations 6
Table des figures 7
Table des tableaux 8
Table des annexes 8
I. Introduction 9
A. Les Néoplasies myéloprolifératives 9
1. Généralités et clinique 9
2. Evolution 11
3. Physiopathologie 13
B. Epigénétique et néoplasies myéloprolifératives 20
1. Généralités sur l'épigénétique 20
2. Mutations d'IDH et pronostic dans les NMP 22
C. Epissage et néoplasies myéloprolifératives 23
1. Mécanismes de l'épissage 23
2. Epissage alternatif 25
3. Régulation de l'épissage 26
4. Anomalies de l'épissage dans les néoplasies myéloprolifératives 27
D. Evénements étudiés 28
1. Anomalies de l'épissage 28
2. Anomalies de l'expression 29
E. Objectifs de la thèse 31
II. Matériels et méthodes 32
A. Patients 32
B. Extraction ARN puis RT et qPCR 32
C. Statistiques 33
III. Résultats 34
A. Validation du modèle *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q 34
B. Recherche d'un potentiel biomarqueur de transformation 38
IV. Discussion 44
A. Validation du modèle *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q 44
B. Recherche d'un potentiel biomarqueur de transformation 46
V. Conclusion 47
VI. Bibliographie 48
Annexes 52

Liste des abréviations

A

ADN acide désoxyribonucléique
AGM Aorte Gonade Mésonéphros
ARN acide ribonucléique

B

BOM biopsie ostéo-médullaire

C

CALR calréticuline
CSH cellule souche hématopoïétique

E

EPO érythropoïétine
ESE exonic splicing enhancer
ESS exonic splicing silencer

G

GCSF granulocyte-colony stimulating factor

H

hnRNP heterogenous nuclear ribonucleoproteins

I

ISE intronic splicing enhancer
ISS intronic splicing silencer

J

JAK2 janus kinase 2

L

LA leucémie aigüe
LMC Leucémie Myéloïde Chronique
LNC Leucémie Chronique à Neutrophiles

M

MFP Myélofibrose Primitive

N

NFS numération-formule sanguine
NMD nonsens-mediated mRNA decay
NMP néoplasies myéloprolifératives

O

OMS Organisation Mondiale de la Santé

P

PCR Polymerase Chain Reaction
pré-MF myélofibrose préfibrotique
PV Polyglobulie de Vaquez

Q

qPCR PCR quantitative

S

SR protéines sérine-arginine protéines

T

TE Thrombocytémie Essentielle
TPO thrombopoïétine

V

VGI volume globulaire isotopique

Table des figures

Figure 1 : Classification OMS 2016 des néoplasies myéloïdes D'après Arber et al., 2016 (1) 9
Figure 2 : Représentation schématique de l'hématopoïèse D'après Mead et Mullaly, 2017 (11) 14
Figure 3 : Mécanismes d'activation des récepteurs couplés à la janus kinase 2 (JAK2). D'après James et al., 2005 (13) 15
Figure 4 : La mutation JAK2V617F provoque l'activation constitutive de JAK2 et, in fine une activation des voies de signalisation indépendante de la fixation du ligand. D'après James et al., 2005 (13)..... 17
Figure 5 : Représentation schématique de la protéine JAK2 tiré de Grinfeld et al, 2017 (20) et Scott et al, 2007 (19)..... 17
Figure 6 : Représentation schématique de la protéine CALR tiré de Grinfeld, et al, 2017 (20) 18
Figure 7 : Répartition des différentes mutations drivers dans les NMP tiré de Grinfeld, et al, 2017 (20)..... 19
Figure 8 : Prévalence des mutations additionnelles dans les NMP tiré de Grinfeld, et al, 2017 (20)..... 19
Figure 9 : Méthylation de l'ADN tiré de McPherson et al, 2017 (24) 20
Figure 10 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle tiré de Rinke et al, 2020 (26) 21
Figure 11 : Représentation schématique des trois séquences consensus tiré de McManus et Graveley, 2011 (33) 23
Figure 12 : Représentation schématique de l'assemblage du spliceosome tiré de Sperling et al., 2008 (34)..... 24
Figure 13 : Exemples d'évènements d'épissage tiré de Hautin et al, 2020 (37) 25
Figure 14 : Expression relative de CCL2, CCRL2, CCL4, CD69 et SAT1 chez des patients NMP avec la mutation IDH2R140Q versus des patients NMP sans mutation d'IDH2. 35
Figure 15 : Expression relative globale d'ITGB3BP, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP avec la mutation IDH2R140Q versus des patients NMP sans mutation d'IDH2..... 36
Figure 16 : Expression relative globale de MAX, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP avec la mutation IDH2R140Q versus des patients NMP sans mutation d'IDH2..... 37

Figure 17 : Expression relative de CCL2, CCRL2, CCL4, CD69 et SAT1 chez des patients NMP au diagnostic puis lors de la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë myéloïde. 39
Figure 18 : Expression relative globale d'ITGB3BP, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP au diagnostic puis lors de la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë myéloïde. 41
Figure 19 : Expression relative globale de MAX, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP au diagnostic puis lors de la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë myéloïde. 42

Table des tableaux

Table 1 : Critères diagnostiques selon l'OMS 2016 D'après Arber et al., 2016 (1) 12
Table 2 : Tableau récapitulatif des modifications d'expression..... 43
Table 3 : Tableau récapitulatif des modifications d'épissage 43

Table des annexes

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des patients inclus..... 52
Annexe 2 : Programme de qPCR..... 53
Annexe 3 : Amorces et concentrations utilisées 53

I. Introduction

A. Les Néoplasies myéloprolifératives

1. Généralités et clinique

Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des hémopathies acquises, clonales, caractérisées par une prolifération cellulaire excessive des lignées hématopoïétiques myéloïdes, sans anomalie de différenciation. La classification des NMP revue en 2016 (1) par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) distingue quatre « grands » syndromes distingués selon le lignage préférentiellement touché, incluant :

- la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC, incidence d'environ 1,3 cas/100000 hab/an),

- la Polyglobulie de Vaquez (PV, incidence d'environ 1 cas/100000 hab/an),

- la Thrombocytémie Essentielle (TE, incidence d'environ 1,6 cas/100000 hab/an),

- la Myélofibrose Primitive (MFP, incidence d'environ 0,25 cas/100000 hab/an) (2),

A ces quatre entités s'ajoutent la myélofibrose préfibrotique (pré-MF), ainsi que des entités plus rares : la Leucémie Chronique à Neutrophiles (LNC), la Leucémie Chronique à Eosinophiles et les néoplasies myéloprolifératives inclassables (Figure 1).

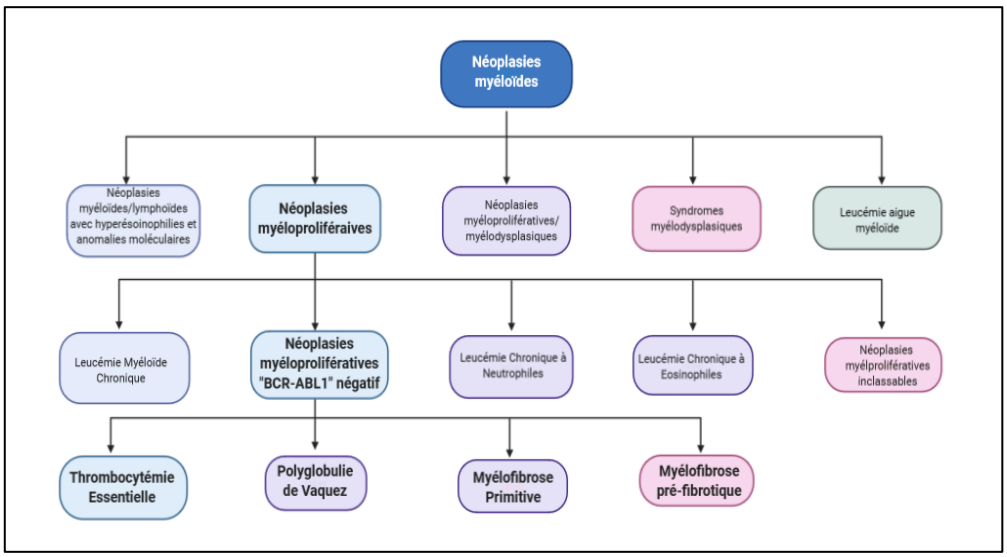

Figure 1 : Classification OMS 2016 des néoplasies myéloïdes
D'après Arber et al., 2016 (1)

Les NMP touchent principalement l'adulte, avec un âge médian au diagnostic de 69 ans pour les hommes et 73 ans chez la femme, avec un sex-ratio de 1.3. Ces pathologies sont de découverte le plus souvent fortuite sur une anomalie de l'hémogramme. Ainsi, le signe annonciateur est souvent un taux d'hémoglobine, de plaquettes et/ou de leucocytes supérieur à la normale, sur plusieurs hémogrames (ou numération-formule sanguine (NFS)) de suite à 3 mois d'intervalle et sans facteurs explicatifs (inflammation, tabagisme, apnée du sommeil, …). Le patient est alors orienté en consultation d'hématologie au cours de laquelle des examens complémentaires vont être prescrits : volume globulaire isotopique (VGI), dosage d'érythropoïétine, biopsie ostéo-médullaire (BOM) et recherche de mutations. Les critères diagnostiques de ces différentes pathologies sont regroupés dans le tableau page suivante (Tableau 1).

Des signes cliniques peuvent être observés au diagnostic ou être le motif de la consultation. Ces signes sont majoritairement liés à l'hyperviscosité (paresthésies, céphalées, troubles visuels, etc.), principalement dans les PV ; à des troubles microvasculaires (érythromélalgie), principalement dans les TE ; à des signes liés aux cytopénies (asthénie, dyspnée, plus rarement infections et hémorragies), ainsi que des signes généraux (asthénie, amaigrissement, sueurs nocturnes, fièvre, prurit), et un syndrome tumoral (splénomégalie et plus rarement hépatomégalie), plus volontiers rencontrés dans la MFP. Les thromboses peuvent également être un mode d'entrée dans la maladie et amener au diagnostic. Elles représentent en outre la principale complication des NMP et sont responsables d'une morbi-mortalité importante : 45% des décès sont dus à des causes cardiovasculaires (3). En effet, la prévalence des thromboses au diagnostic est de l'ordre de 30% pour les PV, 20% pour les TE et 10% pour les MFP (4,5). Peu d'études sont disponibles concernant la prévalence des thromboses dans les pré-MF du fait de la description et de l'introduction assez récente de cette entité au sein de la classification OMS. Toutefois il semblerait que les évènements thrombotiques surviennent dans des proportions similaires aux autres NMP.

2. Evolution

PV et TE sont des pathologies plutôt indolentes, affectant peu la survie globale. Les évènements thrombotiques et hémorragiques constituent la cause principale de morbi-mortalité associée à ces pathologies. Il existe toutefois un risque de transformation vers d'autres hémopathies plus sévères comme la myélofibrose secondaire et la leucémie aigüe (LA).

La myélofibrose secondaire est considérée comme une évolution naturelle de la PV ou de la TE ; avec une incidence cumulée de 5 à 14% à 15 ans pour la PV, et 1,6 à 9% pour la TE (6).

La leucémie aigüe est définie par un pourcentage de blastes sanguins ou médullaires supérieur à 20%. Le risque d'évolution en LA varie selon la présentation au diagnostic, le risque étant plus élevé pour la MFP (risque d'évolution à 10 ans de 10 à 20%), suivie par la PV (2 à 4%) puis la TE (1%). Lorsque le stade de leucémie aigüe est atteint le pronostic est effroyable, avec une médiane de survie inférieure à 6 mois (7).

	Critères majeurs	Critères mineurs	Diagnostic
TE	1. Plaquettes > 450 G/L 2. BOM avec une prolifération mégacaryocytaire 3. Absence de critères OMS pour une LMC, PV, MFP, MDS ou autre néoplasie myéloïde 4. Présence d'une mutation de *JAK2*, *CALR* ou *MPL*	Présence d'un marqueur clonal ou absence d'une cause réactionnelle à la thrombocytose	Soit 4 critères majeurs Soit 3 premiers critères majeurs et critère mineur
PV	1. Hémoglobine > 16,5 g/dL (H) ou 16g/dL (F) ; ou Hématocrite > 49% (H) ou 48% (F) ; ou VGI augmenté de plus de 25% 2. BOM hypercellulaire avec panmyélose 3. Présence de la mutation *JAK2*V617F ou de l'exon 12 de *JAK2*	Niveau d'EPO sérique subnormal	Soit 3 critères majeurs Soit 2 premiers critères majeurs et critère mineur
MFP	1. BOM avec prolifération mégacaryocytaire atypique avec fibrose réticulinique ou de collagène > grade 2 2. Absence de critères OMS pour une LMC, PV, TE, MDS ou autre néoplasie myéloïde 3. Présence d'une mutation de *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou en l'absence de ces mutations, présence d'un marqueur clonal, ou absence de cause réactionnelle à la myélofibrose	1. Anémie sans cause déterminée 2. Leucocytes > 11 G/L 3. Splénomégalie palpable 4. LDH supérieures aux limites pour l'âge 5. Erythromyélémie	3 critères majeurs et au moins 1 critère mineur (confirmé à 2 reprises)
Pré-MF	1. BOM hypercellulaire avec prolifération mégacaryocytaire atypique sans fibrose réticulinique > grade 1 2. Absence de critères OMS pour une LMC, PV, TE, MDS ou autre néoplasie myéloïde 3. Présence d'une mutation de *JAK2*, *CALR* ou *MPL* ou en l'absence de ces mutations, présence d'un marqueur clonal, ou absence de cause réactionnelle à la fibrose réticulinique	1. Anémie sans cause déterminée 2. Leucocytes > 11 G/L 3. Splénomégalie palpable 4. LDH supérieures aux limites pour l'âge	3 critères majeurs et au moins 1 critère mineur (confirmé à 2 reprises)

Table 1 : Critères diagnostiques selon l'OMS 2016
D'après Arber et al., 2016 (1)

3. Physiopathologie

Pour bien cerner les mécanismes en jeu dans le processus pathologique des NMP, il faut tout d'abord s'intéresser à la physiologie de l'hématopoïèse.

a) Pré-requis : Physiologie de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus permettant la production des diverses cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH).

L'hématopoïèse débute dès le 21ème jour de vie embryonnaire au niveau du mésoderme du sac vitellin. Cette hématopoïèse, nommée primitive, est constituée de cellules érythroblastiques et permet une première vascularisation de l'embryon.

En parallèle, l'hématopoïese définitive débute à J28 au niveau de la région Aorte Gonade Mésonéphros (AGM) lorsque des cellules endothéliales subissent une transition endothélio-hématopoïétique pour donner naissance aux cellules souches hématopoïétiques (8). Cet endothélium hémogénique persiste juste après la naissance (9) mais n'a jamais été retrouvé chez l'adulte.

Le site de production des CSH se déplace ensuite de la région AGM vers le foie et la rate, sièges de l'hématopoïèse du 2ème au 5ème mois de vie embryonnaire. La moelle osseuse est progressivement colonisée à partir du 4ème mois de vie embryonnaire, pour devenir l'unique siège de l'hématopoïèse ; au niveau de tous les os de la naissance jusqu'à 4 ans, puis uniquement au niveau des os courts et plats (sternum, crêtes iliaques, vertèbres, crâne, côtes).

La cellule souche hématopoïétique se définit grâce à ses propriétés d'auto-renouvellement, de différenciation, de multipotence et de migration. Une CSH est capable de donner naissance à toutes les cellules hématopoïétiques. En premier lieu elle se différencie en progéniteurs multipotents, ceux-ci se séparant ensuite en progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes, puis en précurseurs spécifiques de lignée. Les cellules filles dérivant d'une même CSH mère constituent alors un clone (Figure 2). Les travaux récents sur l'hématopoïèse remettent en cause cette vision linéaire, avec des passages entre les différents lignages, aux stades précoces (10).

Ces différentes étapes de différenciation et de prolifération cellulaire sont finement régulées par différents acteurs, et notamment par des facteurs de croissance hématopoïétiques. Ceux-ci, en se fixant à leurs récepteurs membranaires spécifiques activent des voies de signalisation intra-cellulaires, responsables de cette expansion. Dans cette introduction je vais uniquement détailler la voie de signalisation JAK2/STAT5, voie principalement impliquée dans la physiopathologie des NMP expliquée ci-après. Toutefois, d'autres voies de signalisation sont impliquées au cours de l'hématopoïèse, comme la voie des MAP kinases ou la voie de la PI3 kinase.

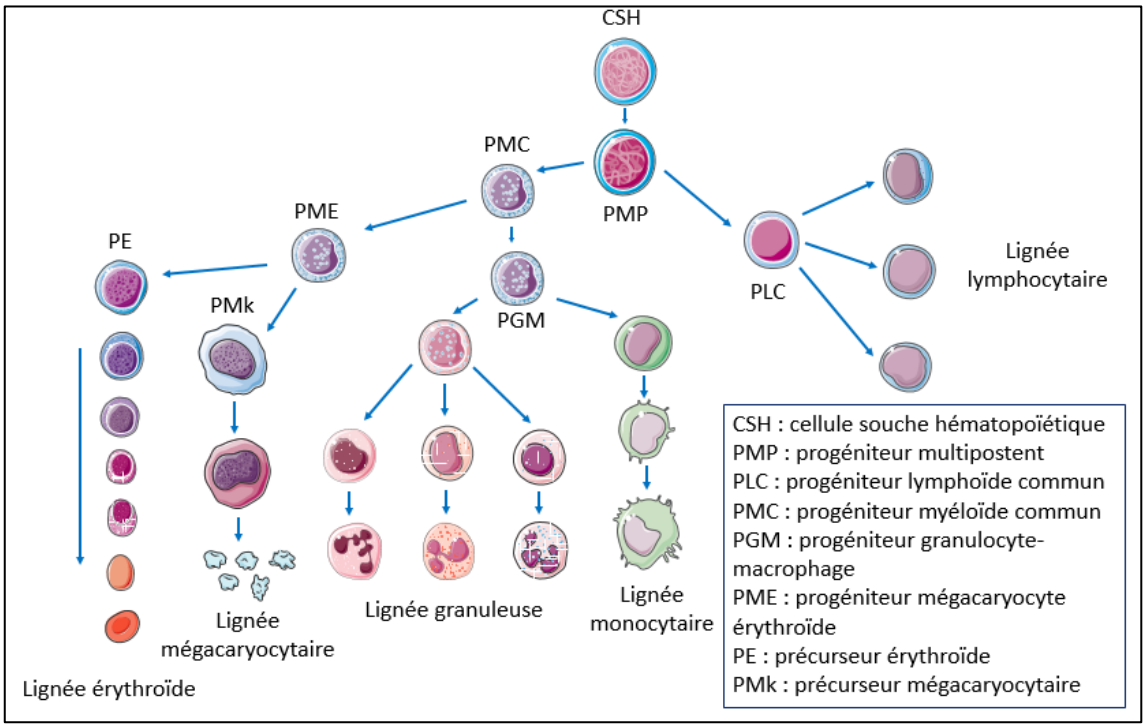

Figure 2 : Représentation schématique de l'hématopoïèse
D'après Mead et Mullaly, 2017 (11)

Les facteurs de croissance hématopoïétiques, agissant tardivement au cours de l'hématopoïèse, responsables de la différenciation vers les différentes lignées sont principalement :

- l'érythropoïétine (EPO) pour l'orientation vers la lignée érythrocytaire ; dont le récepteur membranaire spécifique est l'EPOR,

- la thrombopoïétine (TPO ou THPO) pour l'orientation vers la lignée mégacaryocytaire ; dont le récepteur membranaire spécifique est MPL (également appelé TPOR),

- le *granulocyte-colony stimulating factor* (GCSF ou CSF3) pour l'orientation vers la lignée granulocytaire-monocytaire ; dont le récepteur membranaire spécifique est GSCFR (ou CSF3R),

Les récepteurs de ces cytokines sont des protéines membranaires dont le domaine intracellulaire est associé de façon constitutive à la protéine kinase JAK2, et sont donc des récepteurs "associés à des tyrosine kinases".

Lors de la fixation du ligand (*i.e.* le facteur de croissance hématopoïétique) sur un récepteur cela induit un changement de conformation qui permet la fixation d'une seconde molécule de récepteur, c'est l'homodimérisation. La dimérisation du récepteur permet une autophosphorylation croisée des protéines JAK2, suivie d'une phosphorylation du récepteur. Les résidus ainsi phosphorylés sont reconnus par les protéines STAT5 qui sont à leur tour phosphorylées par JAK2. Les dimères de STAT5 phosphorylés transloquent dans le noyau où ils reconnaissent les séquences promotrices de gènes cibles, et activent leur transcription ; induisant l'orientation vers telle ou telle lignée (12). La phosphorylation du récepteur permet la fixation de protéines initiant les grandes voies de prolifération MAP-K et PI-3K. (Figure 3).

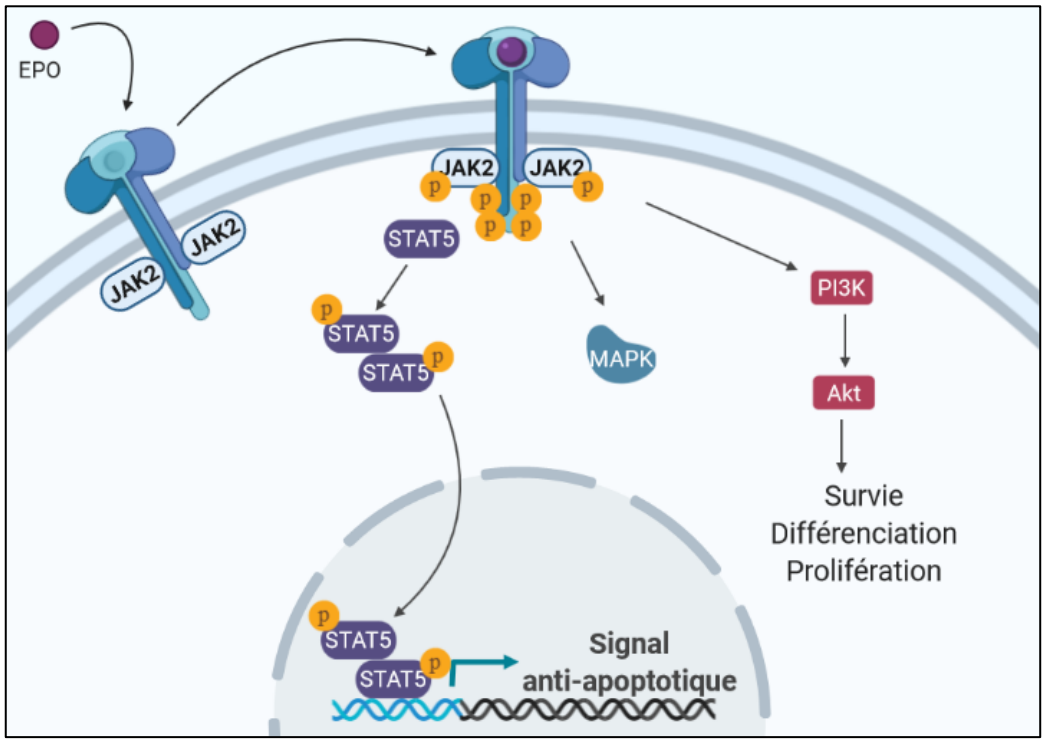

Figure 3 : Mécanismes d'activation des récepteurs couplés à la janus kinase 2 (JAK2).
D'après James et al., 2005 (13)

b) Physiopathologie des NMP

Les néoplasies myéloprolifératives sont, dans la plupart des cas, la conséquence d'une mutation acquise dans une cellule souche hématopoïétique responsable d'un avantage prolifératif, entraînant une hyperplasie clonale d'une ou plusieurs lignées myéloïdes.

La LMC est constamment associée à une fusion génique, le plus souvent due à une anomalie chromosomique, la translocation réciproque et équilibrée t(9;22)(q34.1;q11.2). Le dérivé de chromosome 22 raccourci est nommé chromosome Philadelphie. Cette translocation génère la fusion des gènes *BCR* et *ABL1* aboutissant au gène de fusion *BCR-ABL1* (14). Selon les points de cassure différents transcrits de fusion sont observables, les plus fréquents étant nommés e13a2 et e142a2 (fusions entre les exons 13 ou 14 de *BCR* et 2 d'*ABL1*). La traduction de cet ARN chimérique génère une protéine de fusion ayant l'activité tyrosine kinase d'ABL mais de manière constitutive et dérégulée. Cette activité TK augmentée stimule les voies de signalisation et de prolifération, augmentant la prolifération cellulaire et diminuant l'apoptose d'où une hyperplasie du compartiment myéloïde.

PV, TE, pré-MF et MFP sont généralement distinguées de la LMC et sont regroupées sous le terme de NMP « BCR-ABL1 négatif » ou « Philadelphie négatif ».

Les mutations en cause dans ces pathologies conduisent à une activation constitutive des voies de signalisation de certains récepteurs aux cytokines (principalement l'érythropoïétine, la thrombopoïétine et le *granulocyte colony-stimulating factor*), et donc à une hypersensibilité voire une indépendance à ces dernières. Ces mutations responsables du phénotype pathologique, sont dites "drivers" et sont généralement mutuellement exclusives.

La mutation *JAK2*V617F, décrite en 2005 (15–18), est l'anomalie moléculaire la plus fréquemment retrouvée dans les NMP : 96% des PV et 50 à 60% des TE et MFP (Figure 7). Cette mutation survient en position c.1849 (exon 14) avec une substitution d'un G en T ; ce qui se traduit par la substitution d'une valine en position 617 par une phénylalanine, au niveau du domaine pseudo-kinase JH2 (domaine impliqué dans le rétro-contrôle de l'activité kinase). La protéine JAK2 mutée est activée de manière constitutive, malgré l'absence de ligand et conduit donc à l'activation des voies de signalisation (Figure 4).

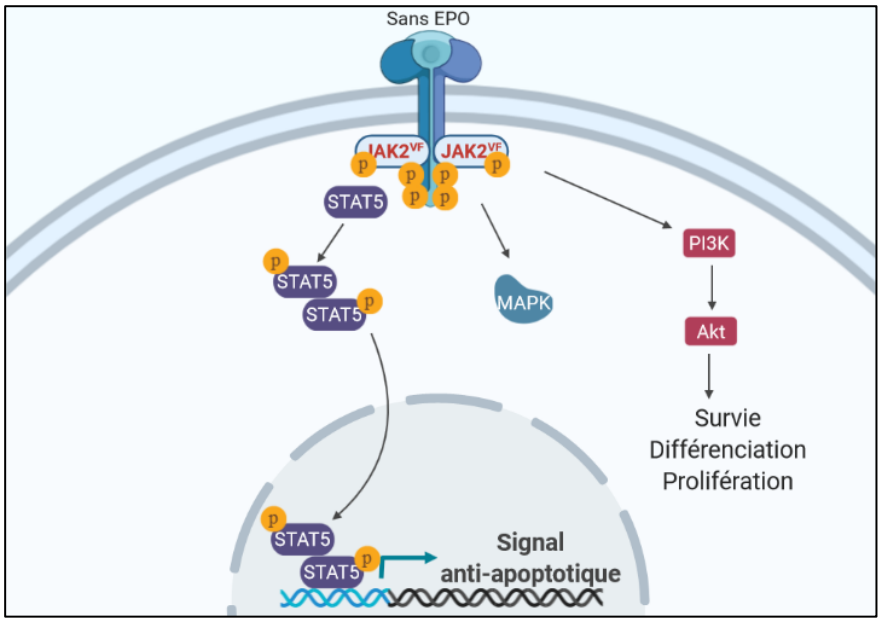

Figure 4 : La mutation JAK2V617F provoque l'activation constitutive de JAK2 et, in fine une activation des voies de signalisation indépendante de la fixation du ligand.
D'après James et al., 2005 (13)

D'autres mutations ont été décrites chez des patients atteints de PV, notamment au niveau de l'exon 12 de *JAK2* (2% des PV) (19) (Figure 7). Ces mutations sont situées dans un domaine linker entre un domaine pseudo-kinase et un domaine Src homologue et perturbent l'inhibition du domaine kinase par le domaine pseudo-kinase (Figure 5).

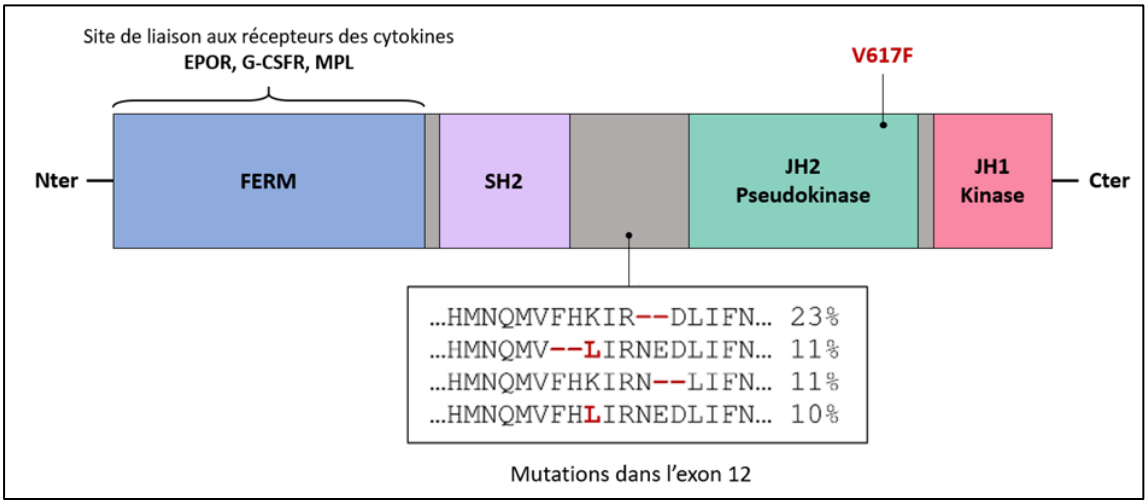

Figure 5 : Représentation schématique de la protéine JAK2
tiré de Grinfeld et al, 2017 (20) et Scott et al, 2007 (19)

Le gène *CALR*, codant la calréticuline, une protéine chaperonne nécessaire au bon repliement des glycoprotéines dont MPL, est également le siège de mutations responsables de NMP (25 à 35% des TE et MFP) (21) (Figure 7). Les deux plus fréquentes sont une délétion de 52 paires de bases (type I) et une insertion de 5 paires de bases (type II) au niveau du dernier exon du gène, responsables d'un décalage du cadre de lecture (Figure 6). Ce décalage du cadre de lecture change la composition C-terminale de la protéine qui devient basique et perd son domaine de rétention au réticulum KDEL. Cette protéine mutée possède alors une liaison altérée avec les domaines glycosylés de MPL et entraîne son homodimérisation responsable de signalisation depuis les compartiments intracellulaires, d'où une activation constitutive de la voie JAK/STAT.

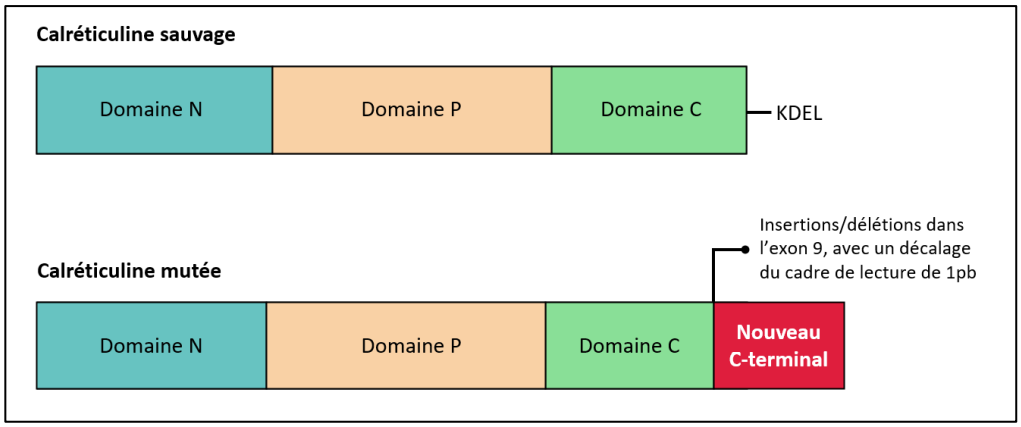

Figure 6 : Représentation schématique de la protéine CALR
tiré de Grinfeld, et al, 2017 (20)

Enfin, des mutations gain de fonction ont été décrites au niveau de l'exon 10 du gène *MPL* (5 à 10% des TE et MFP) (Figure 7). Les deux mutations majoritaires sont les mutations *MPL*W515L et *MPL*W515K, se situant au niveau d'acides aminés trans-membranaires de la protéine. Ces modifications entraînent un changement conformationnel de la protéine, avec un rapprochement des domaines intra-cellulaires et, à l'instar des autres mutations décrites, une activation constitutive du récepteur.

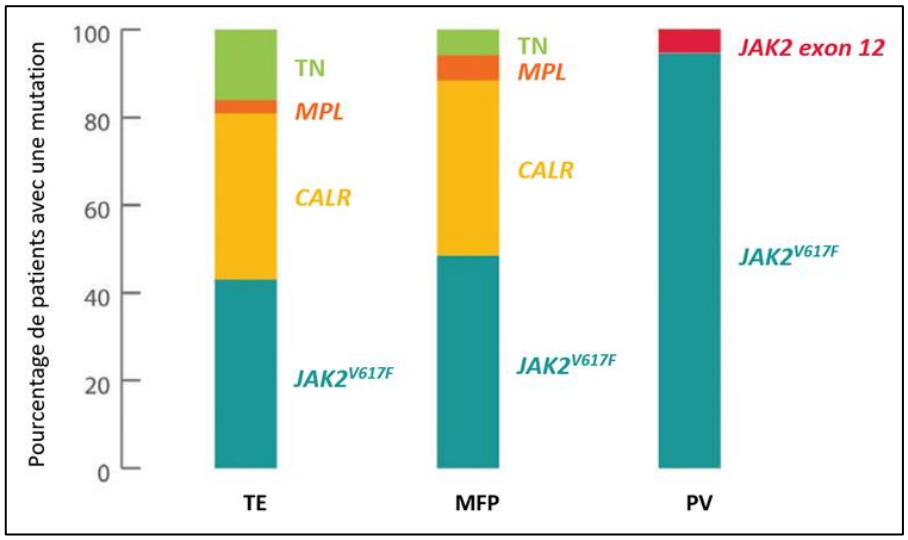

Figure 7 : Répartition des différentes mutations drivers dans les NMP
tiré de Grinfeld, et al, 2017 (20)

En dehors de ces mutations dites "drivers", des mutations dites "additionnelles" viennent compléter le paysage mutationnel observé dans les néoplasies myéloprolifératives. Les techniques de séquençage haut débit comme le NGS ont permis de rechercher et de mettre en évidence bon nombre de ces mutations. Les mutations additionnelles les plus fréquemment retrouvées affectent des gènes impliqués dans la régulation épigénétique comme *ASXL1*, *TET2*, *DNMT3A*, *EZH2* et *IDH* et dans l'épissage comme *SF3B1*, *U2AF1* et *SRSF2* (Figure 8). Les chapitres suivants vont décrire plus en détails les mécanismes d'épigénétique et d'épissage.

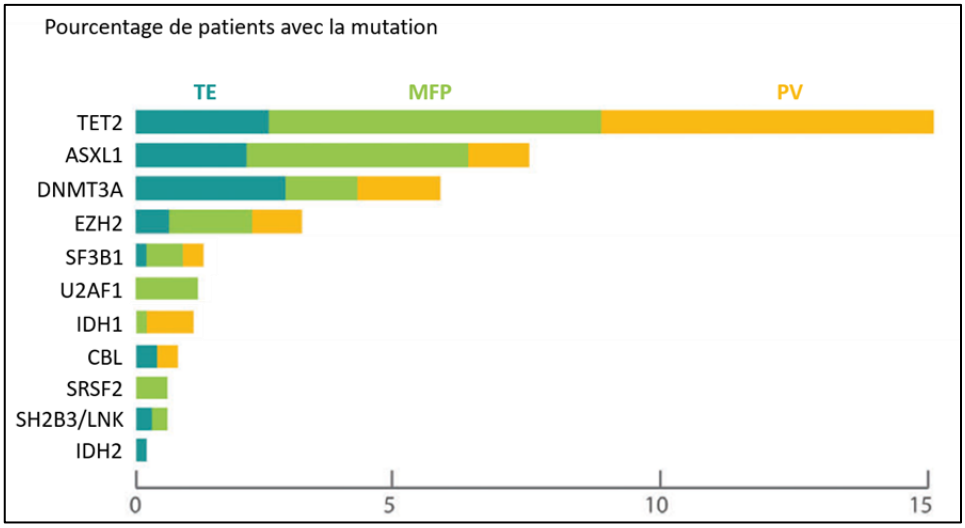

Figure 8 : Prévalence des mutations additionnelles dans les NMP
tiré de Grinfeld, et al, 2017 (20)

B. Epigénétique et néoplasies myéloprolifératives

1. Généralités sur l'épigénétique

Pour rappel dans les cellules eucaryotes, l'ADN génomique est empaqueté sous forme de chromatine. La structure de cette dernière régule les différents processus nucléaires impliquant l'ADN, y compris la transcription, la réplication de l'ADN et la réparation de l'ADN. L'empaquetage de l'ADN dans la chromatine est médié par des protéines chargées positivement : les histones (22). Celles-ci condensent l'ADN et réduisent son accessibilité pour la machinerie de transcription. Le terme épigénétique recouvre les différents changements qui affectent l'expression des gènes mais qui ne sont pas causés par des modifications dans la séquence nucléotidique (23). Par exemple, il s'agit de modifications au niveau des nucléotides ou alors au niveau des histones.

Concernant les modifications de l'ADN, il s'agit principalement de la méthylation et de l'hydroxy-méthylation des cytosines. En effet, plus l'ADN est méthylé, plus il est compacté et moins il sera accessible. Les protéines majoritairement responsables sont DNMT3A et TET2. DNMT3A fait partie de la famille des *DNA méthyltransférases*, enzymes responsables de la méthylation *de novo* de l'ADN au niveau des ilôts CpG. DNMT3A catalyse l'ajout d'un groupe méthyl au niveau des cytosines et transforme donc les cytosines en 5-méthylcytosines. TET2 pour sa part, fait partie de la famille des enzymes *Ten-Eleven-Translocation méthylcytosine dioxygénase*, catalysant l'oxydation des méthylcytosines en hydroxy-méthylcytosines et participant ainsi à la déméthylation de l'ADN. Pour fonctionner TET2 a besoin d'alpha-cétoglutarate, lui-même obtenu à partir de la conversion de l'isocitrate par une enzyme de la famille des *isocitrate déshydrogénase*, IDH (24).

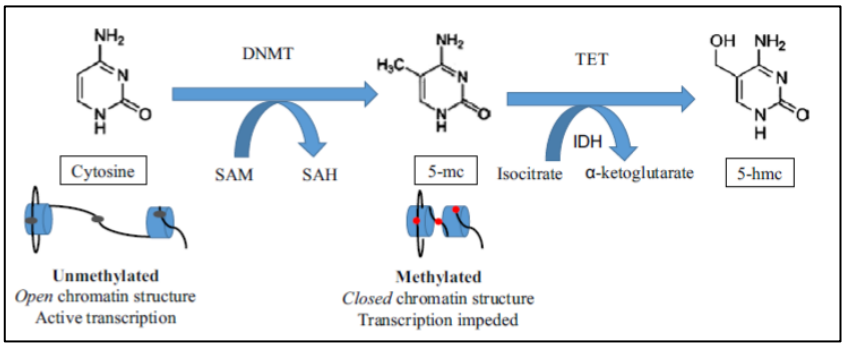

Figure 9 : Méthylation de l'ADN
tiré de McPherson et al, 2017 (24)

Outre aider à la déméthylation de l'ADN et à celle des histones, les protéines IDH sont également essentielles à la biosynthèse des métabolites du cycle de Krebs et à celle de NADPH dans les tissus (25).

Concernant les modifications des histones, elles sont notamment assurées par les protéines du groupe polycomb qui inhibent l'expression des gènes. EZH2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*) est le composant catalytique central du complexe polycomb répressif 2 (PRC2). Au sein de PRC2, EZH2 catalyse la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (26). ASXL1 (*Additional Sex Combs Like 1*) facilite la répression transcriptionnelle des gènes médiée par PRC2 en s'associant avec EZH2.

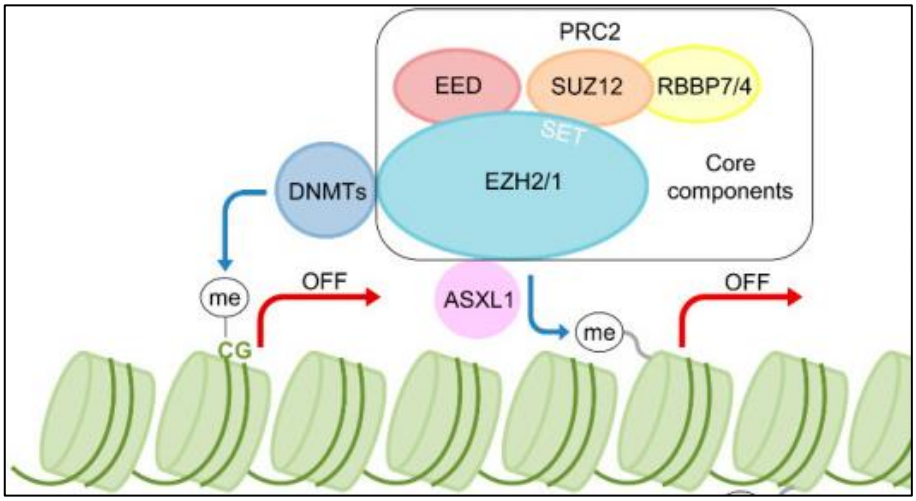

Figure 10 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle
tiré de Rinke et al, 2020 (26)

2. Mutations d'IDH et pronostic dans les NMP

L'accumulation de mutations secondaires est fréquemment associée à la transformation leucémique. Au cours des NMP ceci est particulièrement vrai concernant les mutations d'*ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* et *IDH1/2* (27–29) communément regroupés sous le terme de « mutations de haut risque ». Toutefois ces mutations ne sont pas suffisantes pour promouvoir à elles seules la leucémogénèse (au contraire des mutations « drivers »). Dans un article récent (30), les auteurs ont mis au point une classification génomique des patients atteints de NMP afin de prédire leur évolution, et notamment l'évolution vers la myélofibrose ou la leucémie aigüe. Ils ont montré que les patients présentant une mutation de *TP53* ont un risque plus élevé de transformation vers la LA ; et ceux présentant des mutations au niveau des composant du spliceosome ou des régulateurs épigénétiques ont un risque accru de transformation en MF.

Comme évoqué dans l'avant-propos, dans ce travail je me suis appuyée sur des résultats préliminaires obtenus dans un modèle cellulaire double muté *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q. Parmi toutes les mutations additionnelles que l'on retrouve dans les NMP, je vais donc détailler uniquement les mutations d'*IDH*. Celles-ci sont retrouvées au niveau du site catalytique d'IDH1/2 et entrainent une conversion de l'alpha-cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate, les deux métabolites entrant alors en compétition (31). Ces mutations interfèrent donc avec le processus de déméthylation de l'ADN et des histones. Ces mutations d'*IDH* sont plus fréquemment retrouvées lors des transformations par rapport aux phases chroniques, environ 20% versus 1 à 4% (32), et sont associées à un pronostic péjoratif (33). Il s'agit de mutations récurrentes au niveau du codon 132 pour *IDH1* et 140 pour *IDH2*.

C. Epissage et néoplasies myéloprolifératives

1. Mécanismes de l'épissage

Dans les cellules eucaryotes, l'acide désoxyribonucléique (ADN) est transcrit par l'ARN polymérase II en acide ribonucléique (ARN) pré-messager (pré-ARNm). Cet ARN pré-messager subit ensuite différents processus de maturation pour devenir un ARN messager. L'épissage, permettant l'excision des introns, fait partie de ce processus de maturation.

L'épissage des pré-ARNm nécessite la présence de trois séquences consensus au niveau intronique : une séquence en 5' (site donneur d'épissage 5'), une séquence en 3' (site accepteur d'épissage 3') et une séquence se situant 18 à 40 nucléotides en amont de la séquence 3' (site de branchement) (34) (Figure 9). Ces séquences consensus sont reconnues par un macrocomplexe ribonucléoprotéique, le spliceosome. Celui-ci est constitué de 5 small nuclear RNA (sRNA) associés à des protéines pour former des small nuclear ribonucleoprotein particles (snRNP : U1, U2, U4, U5 et U6) ; et d'autres protéines non associées aux snRNA.

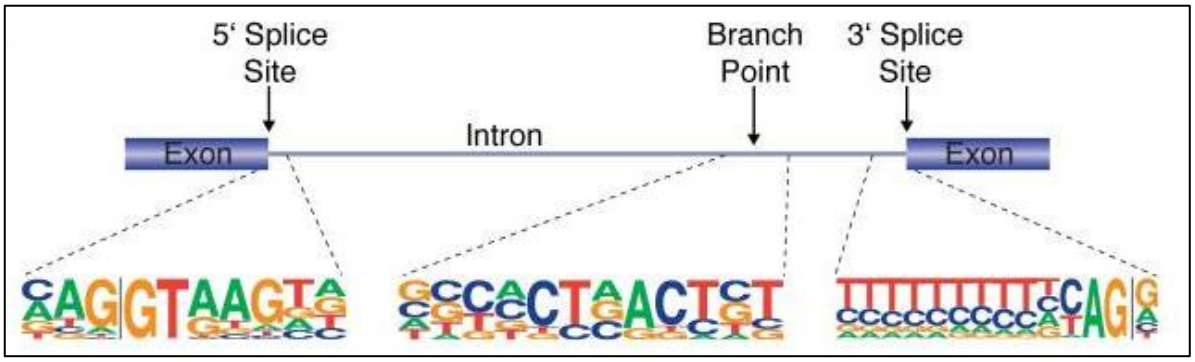

Figure 11 : Représentation schématique des trois séquences consensus
tiré de McManus et Graveley, 2011 (34)

Lors du processus d'épissage, U1 reconnait et se lie au site donneur d'épissage 5', tandis qu'U2 reconnait et se lie au site de branchement (35). U4, U5 et U6 sont alors recrutés, entrainant un changement conformationnel : l'intron forme une boucle (lariat) et le site donneur d'épissage 5' se retrouve à proximité du site de branchement. U1 et U4 sont alors libérés tandis que des appariements nucléotidiques ont lieu entre U6 et U2, ainsi qu'entre U6 et le site d'épissage 5', permettant un rapprochement des trois séquences consensus au sein du spliceosome.

Enfin, deux réactions de transestérification catalysées par U6 ont lieu aboutissant :

- à la jonction des deux exons

- à la libération de l'intron

Les introns libérés au cours du processus d'épissage sont dégradés et l'ARNm produit est exporté dans le cytoplasme où il est traduit (Figure 10).

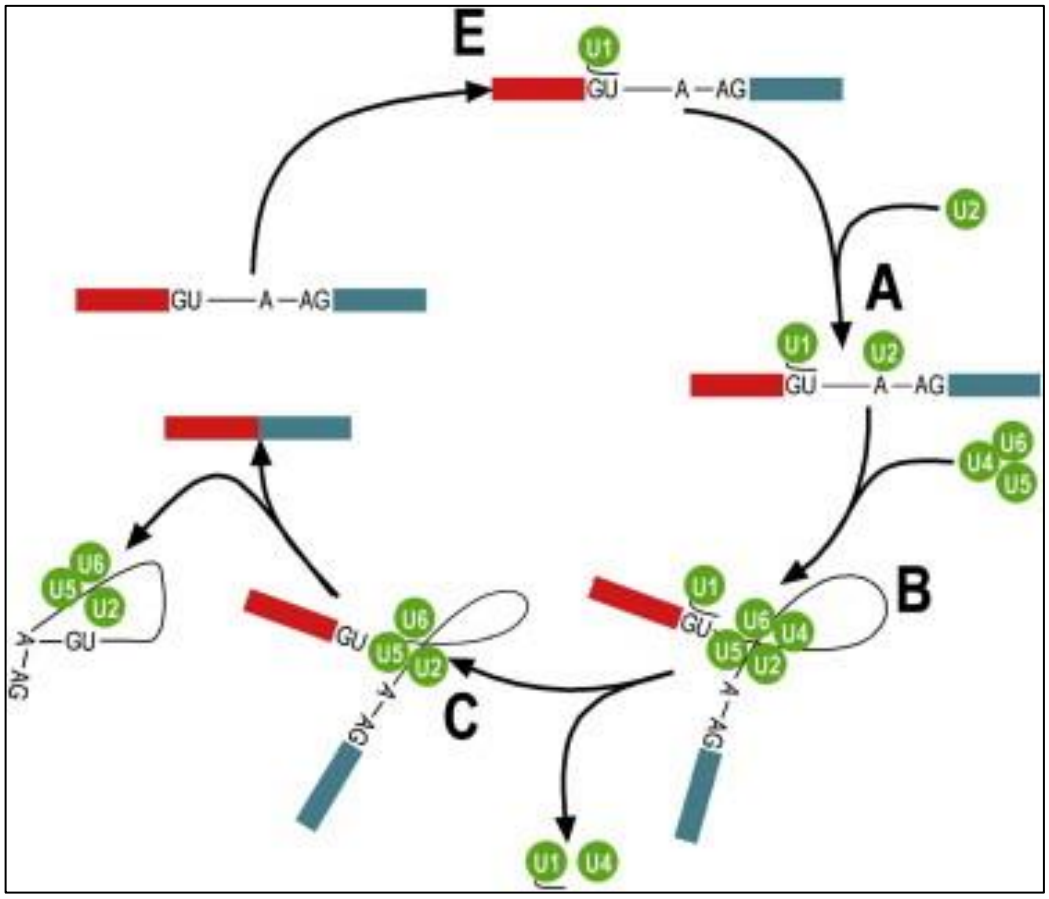

Figure 12 : Représentation schématique de l'assemblage du spliceosome
tiré de Sperling et al., 2008 (35)

Pour certains introns, un complexe alternatif (spliceosome mineur) faisant appel à U11 et U12 au lieu d'U1 et U2 et ne reconnaissant pas les mêmes séquences consensus au niveau du site 5' et du point de branchement, est responsable de l'épissage (36).

2. Epissage alternatif

Grâce à un mécanisme d'épissage alternatif, différents ARNm peuvent être produits à partir d'un même pré-ARNm, participant ainsi à la diversité du protéome. Ainsi, on estime que 95% des gènes humains possédant plusieurs exons sont soumis à un épissage alternatif (37).

L'épissage alternatif peut être causé par des exons mutuellement exclusifs, des exons cassettes, des sites alternatifs d'épissage 5' et 3' ou des rétentions d'introns (Figure 11). La protéine résultant de cet épissage alternatif peut avoir des propriétés différentes, voire opposées, à celle de la protéine issue du transcrit canonique. Ce transcrit alternatif peut également être la cible, si un codon STOP est introduit, d'une dégradation de l'ARNm (NMD nonsense-mediated mRNA decay) entrainant ainsi une régulation négative de l'expression de la protéine (38).

Cet épissage alternatif repose sur la présence de séquences enhancers ou silencers qui promeuvent, ou au contraire répriment, l'utilisation de certains sites d'épissages par rapport à d'autres.

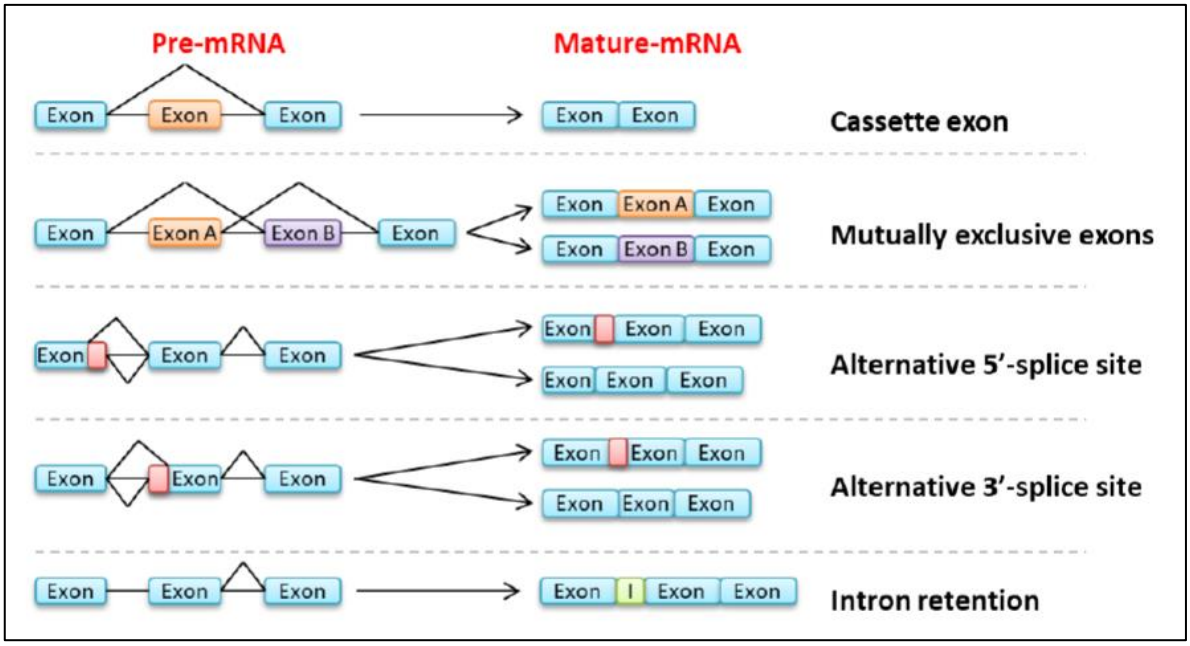

Figure 13 : Exemples d'évènements d'épissage
tiré de Hautin et al, 2020 (38)

3. Régulation de l'épissage

Comme évoqué précédemment l'épissage est régulé par la présence d'éléments cis-régulateurs, les séquences silencers (ISS : intronic splicing silencer et ESS : exonic splicing silencer) et enhancers (ISE : intronic splicing enhancer et ESE exonic splicing enhancer) ; ainsi que par des éléments trans-régulateurs comme les protéines riches en sérine-arginine (protéines SR) et les *heterogenous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP).

Ainsi, la sélection des sites d'épissage repose sur l'interaction des éléments trans-régulateurs avec les éléments cis-régulateurs. Les protéines SR sont majoritairement responsables de l'inclusion d'exons en se liant aux séquences enhancers (ESE et/ou ISE) ; tandis que les hnRNP quant à elles favorisent plutôt le saut d'exon en se liant au séquences silencers (ISS et/ou ESS) (38).

Pour exemple, certains exons entourés par des signaux « faibles » d'épissage, donc non reconnus par le spliceosome résultant en un saut d'exon, peuvent être « compensés » grâce à la liaison des protéines SR à un site ESE résultant dans l'inclusion de cet exon (39).

4. Anomalies de l'épissage dans les néoplasies myéloprolifératives

De nombreuses anomalies relatives à l'épissage ont été décrites dans les cancers et notamment dans les hémopathies, plus particulièrement les myélodysplasies (40). Ces anomalies peuvent être le fait d'altérations au niveau des séquences consensus d'épissage (41) ou des séquences régulatrices (en cis), mais également des altérations au niveau des protéines d'épissage (en trans) entrainant la production de transcrits alternatifs. En outre, il a été démontré que même en l'absence de mutations spécifiques, les programmes d'épissage sont dérégulés dans les cancers, reprogrammant les cellules vers un phénotype immature (38,42). Les causes de ces dérégulations ne sont pas entièrement élucidées, mais reposent au moins en partie sur des modifications des programmes épigénétiques (38,43).

Il existe moins de littérature concernant les dérégulations de l'épissage dans les NMP « Philadelphie-négatives ». Toutefois, les anomalies décrites dans les LAM, une des évolutions possibles de ces hémopathies, suggèrent que les anomalies de l'épissage jouent un rôle dans la physiopathologie des NMP et notamment leurs évolutions indésirables. En effet, il a été démontré que les programmes d'épissage sont dérégulés dans la LAM, même en l'absence de mutations du spliceosome (38,44). Dans ce dernier article les auteurs ont montré qu'environ 30% des gènes des patients atteints de LAM étaient épissés de manière aberrante par rapport aux donneurs sains. D'autres auteurs ont identifié quatre gènes dont l'épissage alternatif dans la LAM est corrélé avec le pronostic des patients (45), permettant ainsi d'établir une « signature d'épissage ».

De manière intéressante, pour illustrer ce lien étroit entre épigénétique et épissage, il a été démontré que les mutations d'*IDH1/2* augmentent les anomalies d'épissage lorsqu'elles sont associées aux mutations de *SRSF2* et/ou de *JAK2* (38). Les voies principalement affectées par cette dérégulation de l'épissage entraîné par les mutations d'*IDH* sont elles-mêmes impliquées dans la régulation de l'épissage, générant ainsi une dérégulation globale.

D. Evénements étudiés

Comme évoqué dans l'avant-propos, dans ce travail je me suis appuyée sur des résultats préliminaires obtenus dans un modèle cellulaire double muté *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q. Les anomalies observées sont décrites à suivre.

1. Anomalies de l'épissage

Le premier gène étudié est *ITGB3BP* (*Integrin subunit beta 3 binding protein)*, également dénommé *CENPR* ou *NRIF3*. Ce gène code un co-régulateur de la transcription situé dans le noyau. En effet, il est engagé dans la co-activation des récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes et aux rétinoïdes X (46). Il a été démontré qu'ITGB3BP est impliqué dans la tumorogenèse et joue notamment un double rôle dans un modèle de cancérogénèse cutanée : il agit comme un suppresseur de tumeur dans les stades précoces, puis comme un promoteur dans la progression du cancer (47). Par un mécanisme d'épissage alternatif une forme avec inclusion de l'exon 10 d'ITGB3BP a été mise en évidence (48) ; la forme canonique excluant l'exon 10. A l'instar de la forme canonique, la forme alternative provoque l'apoptose de cellules tumorales de sein. Dans le modèle cellulaire double muté il a été observé une diminution de la forme alternative (avec inclusion de l'exon 10) par rapport aux cellules sauvages à J7 comme à J14.

Le second gène étudié est *MAX (MYC-associated factor X)*. Il code une protéine exprimée dans de nombreux tissus, tumoraux ou non (49). Via le complexe MAX-MYC, elle joue un rôle dans de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Récemment il a été démontré que l'absence d'expression de MAX est un potentiel biomarqueur de mauvais pronostic dans le lymphome anaplasique à grandes cellules (49). La forme canonique de MAX est l'isoforme A. Par le biais de l'épissage alternatif deux autres isoformes peuvent être obtenues. L'isoforme I inclut l'exon 5 alternatif, et l'isoforme C quant à elle inclut également l'exon 5 ainsi qu'une région 5' alternative (50). L'exon cassette inclus dans ces deux isoformes entraîne l'apparition d'un codon STOP, rendant l'ARNm sensible au NMD. Toutefois une autre étude dans le glioblastome a montré une expression protéique de l'isoforme C, contribuant à la croissance tumorale (51). Dans le modèle cellulaire double muté *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q il a été retrouvé un ratio en faveur de l'isoforme A à J7, et des isoformes C et I à J14 par rapport aux cellules double sauvage.

2. Anomalies de l'expression

De même nous avons souhaité confirmer ou infirmer la présence de modification d'expression de certains gènes :

Le gène *CCL2 (CC-chemokine ligand 2)*, également appelé *MCP-1*, code une chimiokine exprimée par de nombreuses cellules dont les cellules myéloïdes (52). Elle permet la migration des cellules au cours de la réponse immunitaire mais également lors des processus pathologiques comme les cancers. En dehors de ces effets chémo-attractants, CCL2 possède aussi des fonctions dans l'adhérence, la maturation et la différenciation myéloïde, ainsi que dans la survie cellulaire (résistance à l'apoptose). *CCL2* est retrouvé dans la circulation et serait un potentiel biomarqueur dans le cancer du sein (53) et de la prostate (54). Dans le modèle cellulaire double muté ce gène est sous-exprimé à J7 et sur-exprimé à J14 par rapport aux cellules doubles sauvages.

Le gène *CCRL2*, également appelé *CCR2*, code le récepteur de CCL2 et se retrouve impliqué dans les mêmes effets que décrits précédemment. CCRL2 est également un récepteur pour d'autres chimiokines de la même famille que CCL2. A l'instar de CCL2, CCRL2 a été détecté dans de nombreuses tumeurs, dont celles du sein, de l'endomètre, du colon et de la prostate (53). Dans le modèle cellulaire double muté CCRL2 est sous-exprimé à J7 et sur-exprimé à J14 par rapport aux cellules doubles sauvages.

Le gène *CCL4*, également appelé *MIP-1β*, code une chimiokine impliquée dans la migration des cellules hématopoïétiques et des cellules cancéreuses, ainsi que dans leur prolifération et leur survie via sa liaison à CCR5 (55). Des taux accrus de CCL4 ont été mis en évidence dans la moelle osseuse de patients atteints de LMC (56). Ce gène est sur-exprimé à J7 comme à J14 dans les cellules doubles mutées par rapport aux cellules sauvages.

Le gène *CD69* code un récepteur transmembranaire de la famille des lectines exprimé à la surface des lymphocytes T (57). Il s'agit d'un marqueur précoce de l'activation lymphocytaire mais également d'un facteur important dans la régulation des réponses immunitaires. Les taux de CD69 sont élevés dans plusieurs hémopathies malignes comme la LMC, le lymphome de Burkitt lié à l'Epstein-Barr virus, la leucémie à lymphocytes T ou la Leucémie Lymphoïde Chronique (58). Dans cette dernière étude, les auteurs ont démontré que CD69 participe à l'inhibition de l'apoptose et de la différenciation érythroïde dans un modèle cellulaire BCR-

ABL1. Dans le modèle cellulaire double muté ce gène est sous-exprimé à J7 et sur-exprimé à J14 par rapport aux cellules doubles sauvages.

Le gène *SAT1* (*spermidine/spermine Gène N1-acétyltransférase 1*) code une enzyme impliquée dans le catabolisme des polyamines. Il s'agit également d'une cible de p53 (59). L'activation de SAT1 induit la peroxydation lipidique et provoque la mort cellulaire, notamment dans des modèles tumoraux. L'expression de *SAT1* est donc négativement régulée dans les tumeurs. Dans le modèle cellulaire double muté, ce gène est sous-exprimé à J7 et sur-exprimé à J14 par rapport aux cellules doubles sauvages.

E. Objectifs de la thèse

L'expression et l'épissage de certains gènes sont modifiés dans nombre de cancers et notamment dans les hémopathies. Peu de données existent dans les néoplasies myéloprolifératives « Philadelphie-négatifs », alors que des modifications ont été clairement démontrées dans d'autres hémopathies, et ce d'autant plus que la maladie est à un stade avancé. Ces anomalies sont décrites comme importantes dans la leucémogenèse.
Comme évoqué dans l'avant-propos, l'équipe a étudié grâce à des analyses de RNA-seq dans une lignée cellulaire mégacaryoblastique exprimant la mutation canonique *JAK2*V617F ainsi que la mutation additionnelle *IDH2*R140Q, l'expression et l'épissage de l'ARNm. Il nous a semblé pertinent de valider dans des cellules primaires de patients ces évènements observés.

Le but de cette thèse est donc d'analyser, au niveau des 7 gènes décrits ci-avant, sélectionnés pour leurs fonctions dans l'hématopoïèse, la réponse immunitaire/inflammation et/ou la tumorogenèse, l'expression de transcrits (alternatifs ou non) chez des patients atteints de néoplasies myéloprolifératives avec une mutation additionnelle *IDH2*R140Q par rapport à des patients ne présentant pas cette mutation. De plus, cette mutation étant associée à un risque de transformation en LAM élevé, nous avons poursuivi les analyses en comparant des patients atteints de néoplasies myéloprolifératives en phase chronique puis en phase évoluée. Ceci afin de mettre en évidence un éventuel biomarqueur d'acutisation chez ces patients.

II. Matériels et méthodes

A. Patients

Tous les patients ont donné leur consentement éclairé par écrit pour que leurs prélèvements soient utilisés dans un cadre de recherche. Le diagnostic de NMP (PV, TE et MFP) a été posé en fonction des critères OMS en vigueur à l'époque du diagnostic.

D'une part, nous avons sélectionné des patients NMP ayant transformé en LA ou en MF secondaire avec des prélèvements disponibles au diagnostic (ou en phase chronique) et à la transformation. D'autre part nous avons sélectionné des patients NMP présentant une mutation *IDH2*R140Q, que nous avons apparié avec des patients NMP ne présentant pas cette mutation additionnelle. L'appariement a été réalisé sur la base de l'âge, du sexe et de la mutation driver.

Le tableau récapitulatif des patients est en annexe (Annexe 1).

B. Extraction ARN puis RT et qPCR

Les extractions d'ARN ont été réalisées à partir de culots cellulaires additionnés de TRIzol (*Invitrogen*) selon une méthode dérivée de la technique de Chomczynski et al (60). Le dosage a été effectué à l'aide du NanoDrop-2000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*). Les rétrotranscriptions ont été réalisées à partir de 1µg d'ARN selon les recommandations émises par le programme EAC, Europe Against Cancer (61).

Les PCR quantitatives (qPCR) ont été réalisées à partir de 2,5 ng d'ADNc, à l'aide de Master Mix 2X Power SYBR®Green (*Applied Biosystems*) sur ABI PRISM 7300 (*Applied Biosystems*). La GAPDH a été utilisée comme contrôle endogène, tandis que l'ADNc de cellules UT-7 non transduites et non induites a été utilisé comme standard. Le programme de qPCR est détaillé en annexe (Annexe 2).

Les amorces utilisées ainsi que leur concentration sont détaillées en annexe (Annexe 3).

A chaque cycle, en fin de phase d'élongation, l'appareil mesure la fluorescence émise par le SYBRGreen, qui fluoresce lorsqu'il est intercalé à l'ADN. L'émission de fluorescence correspond au reflet de la quantité d'ADN synthétisé à chaque cycle, et qui permet de

déterminer la valeur Ct. Cette valeur correspond au cycle de seuil (cycle threshold en anglais), et représente le nombre de cycles d'amplification nécessaires afin d'atteindre une valeur seuil de fluorescence. A la fin du programme, l'appareil réalise une courbe de fusion permettant de vérifier la présence ou l'absence d'amplicons aspécifiques. L'expression relative des gènes a été calculée par le biais de la méthode $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (62).

C. Statistiques

Les tests statistiques et les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Les comparaisons ont été effectuées à l'aide d'un test de Wilcoxon pour échantillons appariés. Les résultats sont considérés comme significatifs si $p < 0,05$, alors notifié * sur les graphiques.

III. Résultats

A. Validation du modèle *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q

Comme expliqué dans les objectifs de la thèse, la première partie de ce travail consiste à valider le modèle cellulaire *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q mis en place par l'équipe ; ceci en analysant dans des cellules primaires de patients les différents gènes retrouvés modifiés lors des analyses de RNA-seq sur lignée cellulaire.

La Figure 14 montre l'expression relative globale des différents gènes cibles chez des patients atteints de NMP et présentant une mutation *IDH2*R140Q et chez des patients atteints de NMP appariés ne présentant pas la mutation. On n'observe pas de différence significative entre ces deux groupes. Toutefois, il semblerait que l'expression de *CCL2* soit plus élevée au dans le groupe *IDH2*R140Q, avec des patients contrôles très regroupés, et deux patients *IDH2*R140Q plus élevés que les autres ; mais ceci n'est pas confirmé par les tests statistiques. Les deux mêmes patients mutés sont ceux qui expriment plus fortement le *CD69*. Pour les autres gènes cibles nous n'observons pas de tendance franche dans les variations entre le groupe muté et le groupe contrôle. La tendance à la diminution pour *CCRL2* et *CCL4* provient du même patient contrôle qui semble sur-exprimer ces différentes cibles.

Ensuite, la figure 15 présente l'expression relative globale et des différents transcrits d'épissage d'*ITGB3BP* chez des patients atteints de NMP et présentant une mutation *IDH2*R140Q, et chez des patients atteints de NMP appariés ne présentant pas la mutation. Les patients du groupe contrôle présentent des valeurs très regroupées de l'isoforme alternative (et par extension de l'expression totale), il semble donc que ce groupe ait une expression relative plus faible de l'isoforme alternative mais cela n'est pas confirmée par les tests statistiques. De plus, cette tendance est gommée lorsqu'on regarde le ratio de l'isoforme alternative sur l'isoforme canonique. Cela peut être expliqué par un point systématiquement plus élevé dans le groupe des patients *IDH2*R140Q, tant pour l'expression totale d'*ITGB3BP* que pour ses deux isoformes, entrainant donc une expression relative moyenne plus importante dans le groupe *IDH2*R140Q. En analysant le ratio des deux isoformes ce patient ne se détache plus de son groupe d'appartenance.

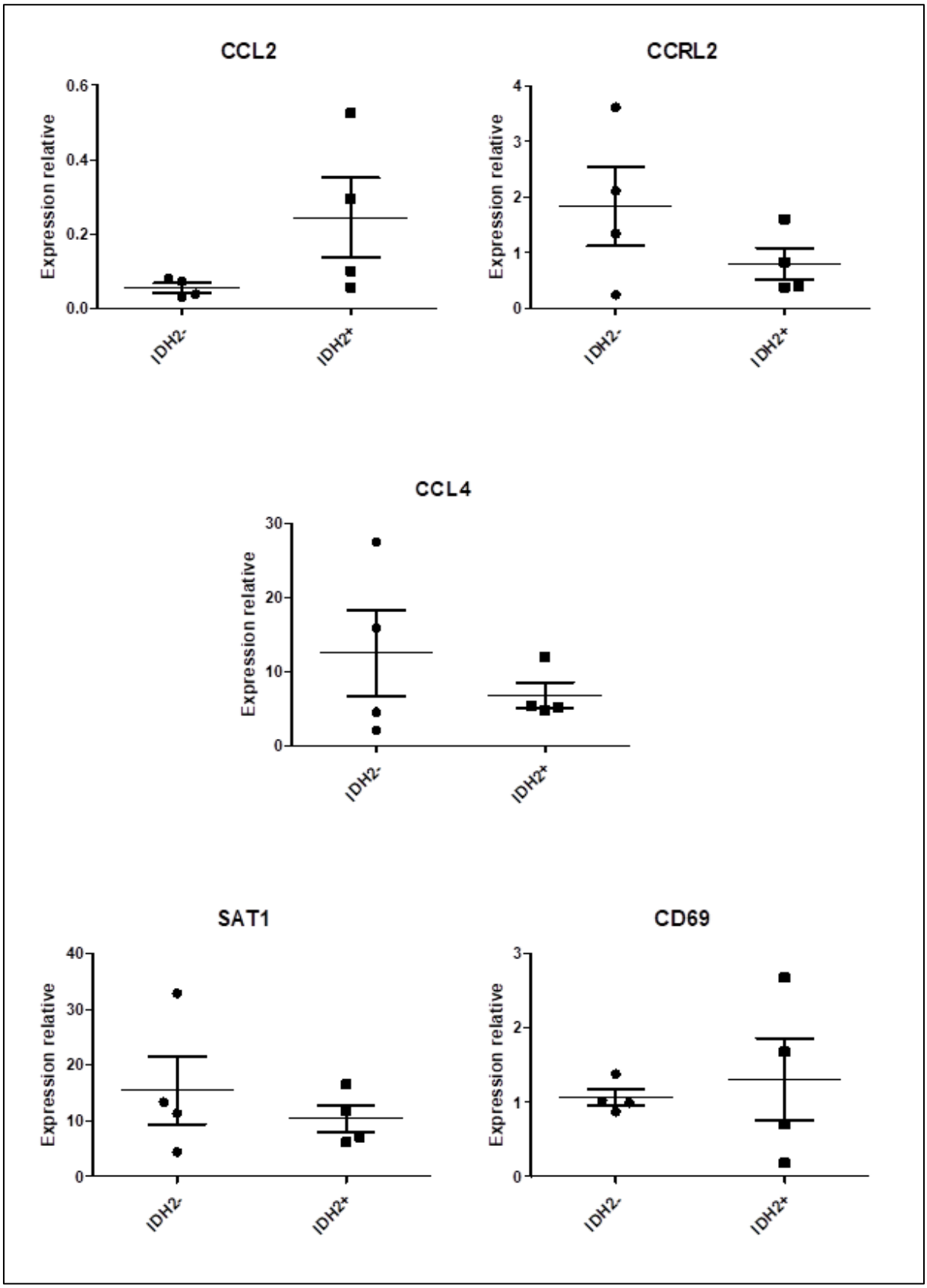

Figure 14 : Expression relative de *CCL2*, *CCRL2*, *CCL4*, *CD69* et *SAT1* chez des patients NMP avec la mutation *IDH2*R140Q versus des patients NMP sans mutation d'*IDH2*.

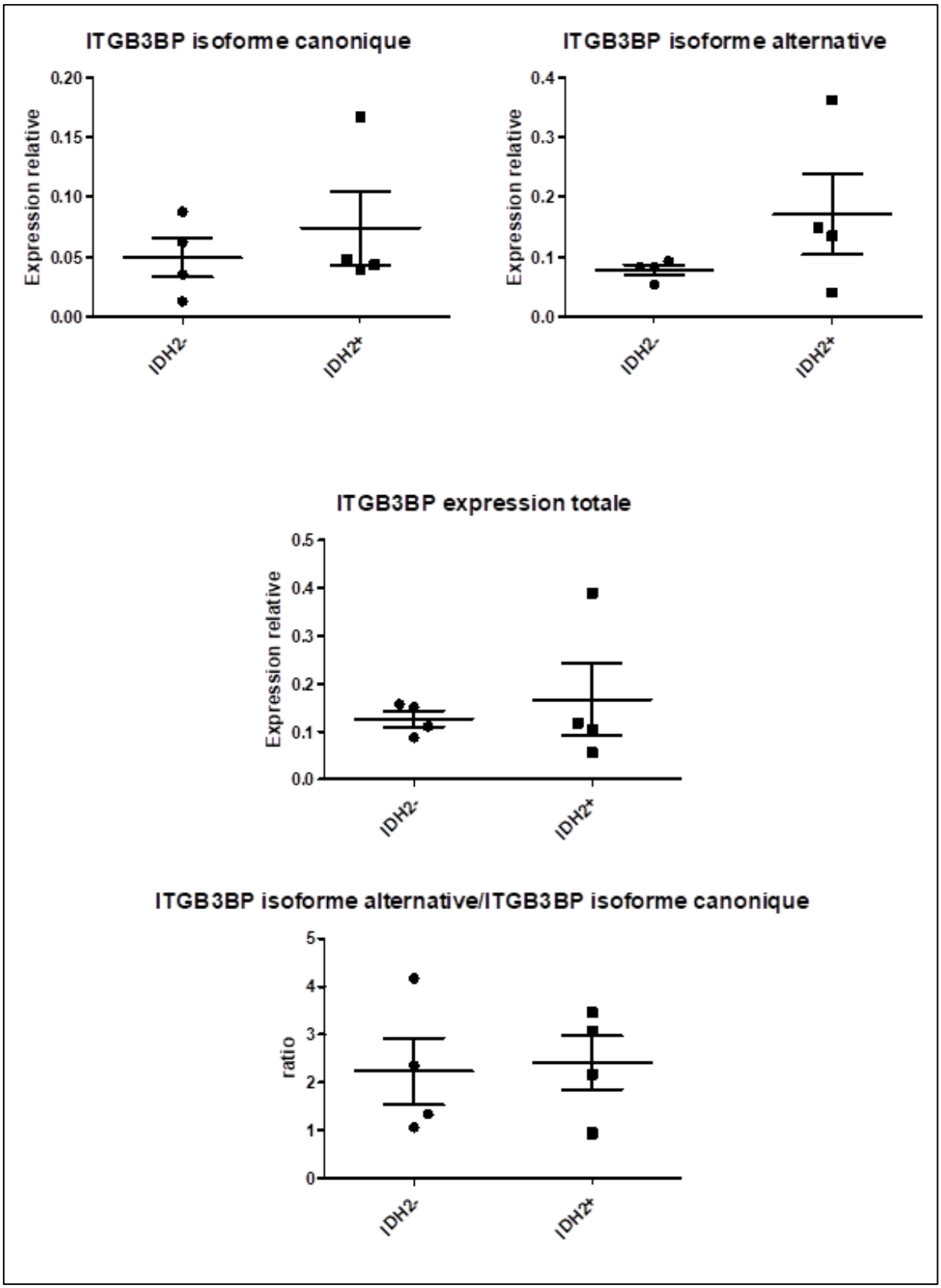

Figure 15 : Expression relative globale d'ITGB3BP, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP avec la mutation *IDH2*R140Q versus des patients NMP sans mutation d'*IDH2*.

Enfin, le figure 16 montre l'expression relative globale et des différents transcrits d'épissage de *MAX* chez des patients atteints de NMP et présentant une mutation *IDH2*R140Q et chez des patients atteints de NMP appariés ne présentant pas la mutation ; ainsi que le ratio des isoformes alternatives sur l'isoforme canonique. Même si les graphiques semblent indiquer une expression relative globalement plus élevée dans le groupe présentant la mutation additionnelle, et ce quelle que soit l'isoforme analysée, cette tendance n'est pas retrouvée dans les analyses statistiques. De plus les ratios sont stables entre le groupe contrôle et le groupe muté.

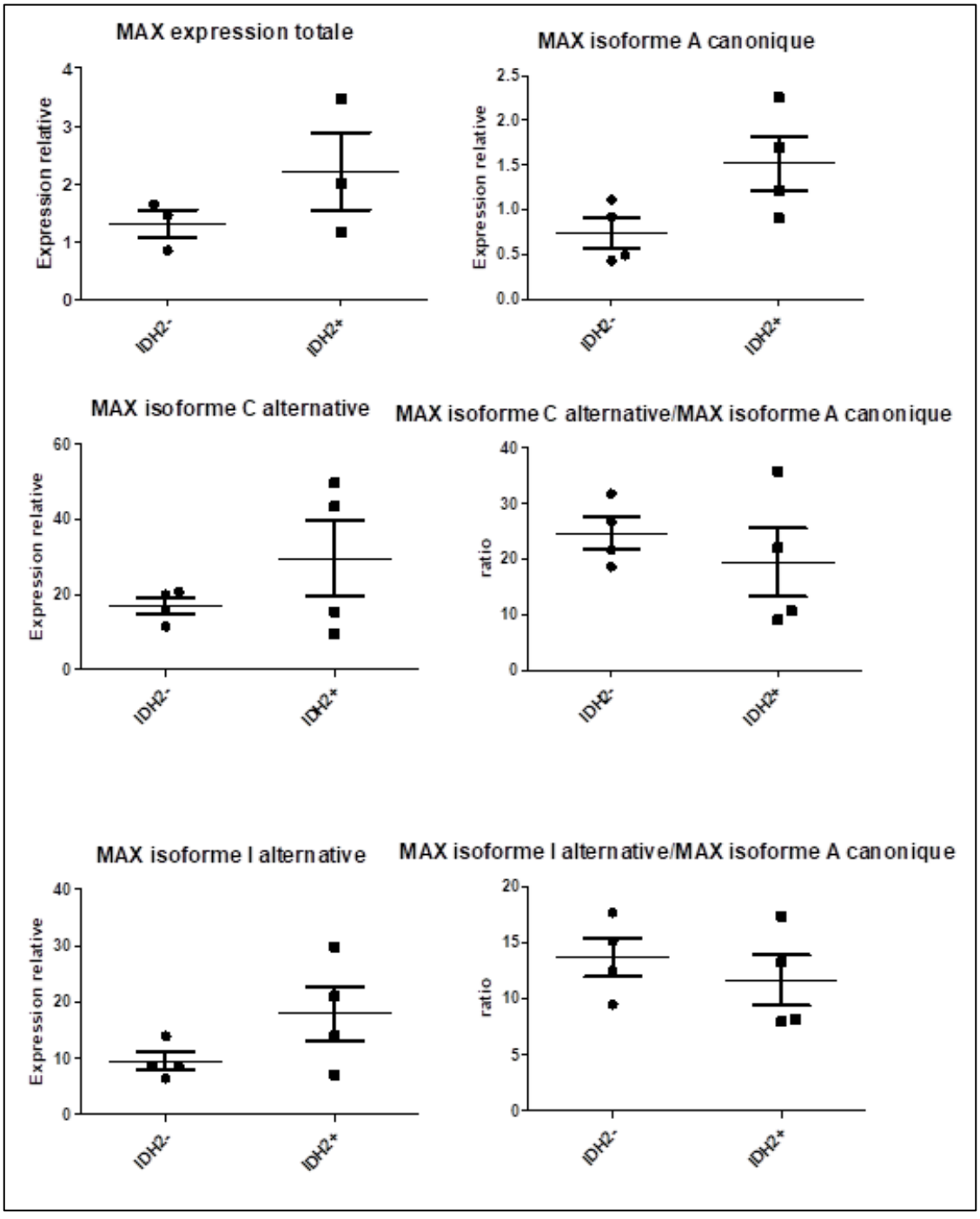

Figure 16 *:* Expression relative globale de *MAX*, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP avec la mutation *IDH2*R140Q versus des patients NMP sans mutation d'*IDH2*.

B. Recherche d'un potentiel biomarqueur de transformation

Les mêmes analyses sont réalisées chez les patients atteints de NMP au diagnostic puis à la transformation en LAM ou en MF secondaire. En effet nous cherchons à mettre en évidence un gène dont l'expression ou l'épissage serait modifié lors de la transformation afin, dans un second temps, de l'étudier plus avant dans le but d'en faire un potentiel biomarqueur.

Ainsi, la figure 17 présente l'expression relative globale des différents gènes cibles. Pour *CCL2* le sens d'évolution est similaire pour tous les patients avec une diminution lors de la transformation en leucémie aiguë par rapport au diagnostic (p=0,0625) ; avec un point au diagnostic particulièrement élevé par rapport aux autres qui peut expliquer cette tendance. Cette même tendance est visible pour le gène *SAT1* ; cependant ce n'est pas le même patient qui présente une surexpression de *CCL2* et de *SAT1*. Concernant l'expression de *CCRL2* il semblerait que celle-ci soit plus élevée au diagnostic, avec deux patients qui se détachent, mais cette tendance n'est pas confirmée par les tests statistiques. Il s'agit des deux mêmes patients qui expriment plus fortement *CCL4* au diagnostic. Concernant *CD69*, l'expression relative semble globalement stable entre le prélèvement au diagnostic et celui à l'acutisation en LA.

Pour les analyses comparatives du groupe avec transformation en myélofibrose secondaire l'évolution de l'expression des différents gènes cibles est variable. Pour *CCL2* et *CCRL2*, la tendance semble être à la diminution lors de la transformation, avec cependant un patient qui évolue en sens inverse. Il ne s'agit pas du même patient pour ces deux gènes. Toutefois ce sont ces deux patients qui présentent une augmentation de l'expression de *CD69* à la transformation alors que le reste du groupe tend à diminuer. A noter cependant qu'aucune de ces tendances n'est confirmée lors des tests statistiques. Pour *CCL4*, on remarque une différence significative (p=0,0313) avec une expression plus élevée au diagnostic qu'à la transformation. D'ailleurs, seuls certains patients de ce groupe avec transformation en myélofibrose secondaire présentent des valeurs d'expression relative aussi élevées au diagnostic. Enfin concernant *SAT1*, le sens d'évolution est variable entre le diagnostic et la transformation en myélofibrose secondaire.

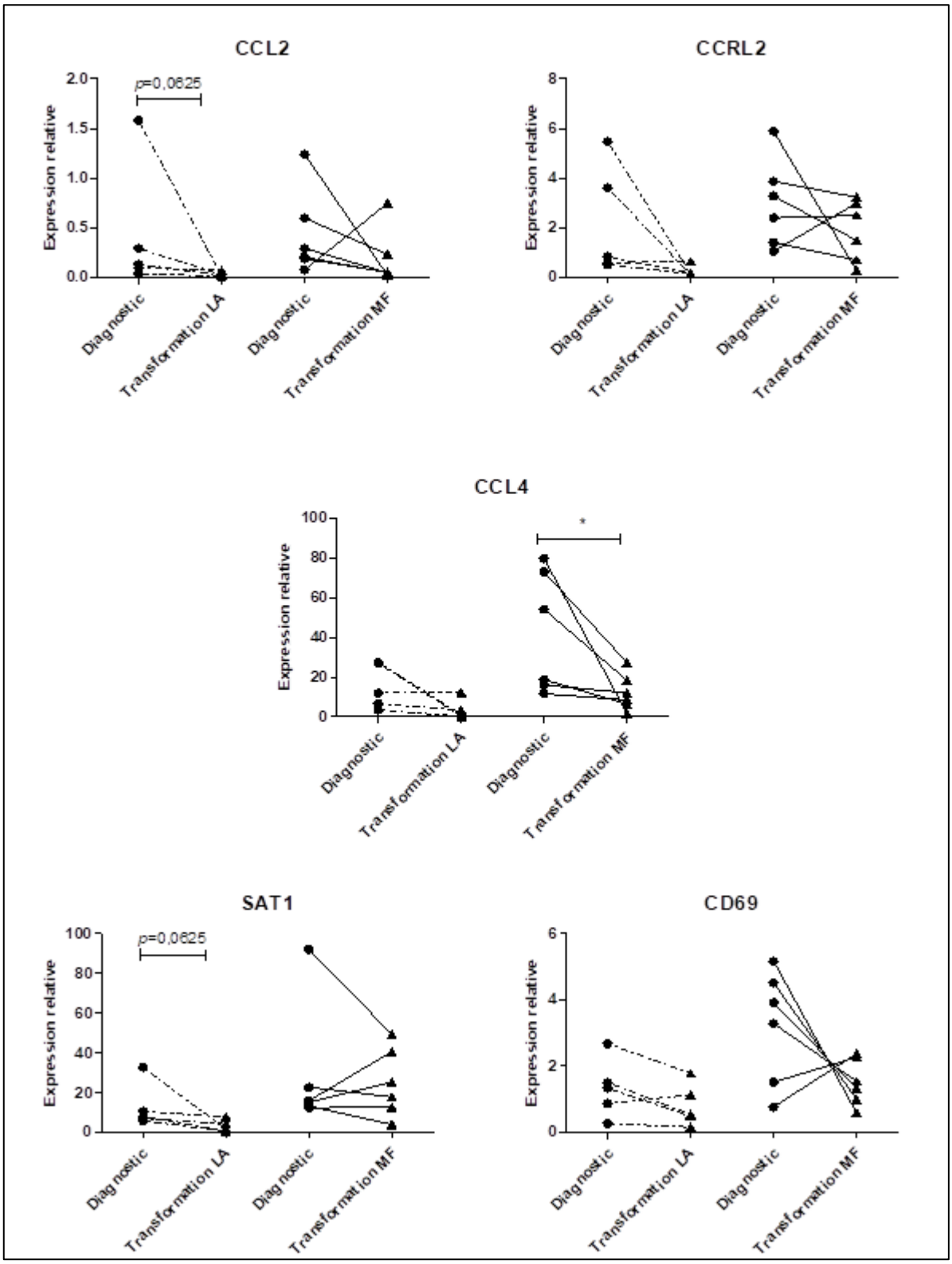

Figure 17 : Expression relative de *CCL2*, *CCRL2*, *CCL4*, *CD69* et *SAT1* chez des patients NMP au diagnostic puis lors de la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë myéloïde.

Puis, la figure 18 montre l'expression relative globale et des différents transcrits d'épissage d'*ITGB3BP* chez des patients atteints de NMP au diagnostic et à la transformation. Concernant le groupe qui acutise en leucémie aiguë, nous n'observons pas de différence significative sur ces analyses. Les sens d'évolution sont variables entre les patients mais globalement l'expression est stable entre les différents temps d'analyse.

Pour le groupe qui transforme en myélofibrose, un patient se détache du groupe avec une expression de la forme canonique, et par extension de la forme totale, plus élevée que les autres patients, au diagnostic comme lors de l'évolution. Toutefois cela n'a pas d'impact sur le ratio de l'isoforme alternative sur l'isoforme canonique qui lui reste proche de ceux des autres patients.

Pour finir, la figure 19 présente l'expression relative globale et des différents transcrits d'épissage de *MAX* ainsi que le ratio des isoformes alternatives sur l'isoforme canonique. On n'observe pas de différence significative entre les patients au diagnostic et ces mêmes patients à la transformation, que ce soit une acutisation en LA ou une évolution en MF secondaire ; avec des sens d'évolution variable selon les temps et les gènes cibles.

L'ensemble des résultats est regroupé dans les tableaux 2 et 3. Globalement, on remarque que les différents marqueurs sont plus bas lors de l'acutisation en leucémie aiguë qu'au diagnostic, et qu'ils sont intermédiaires à ces deux stades lors de la transformation en myélofibrose secondaire.

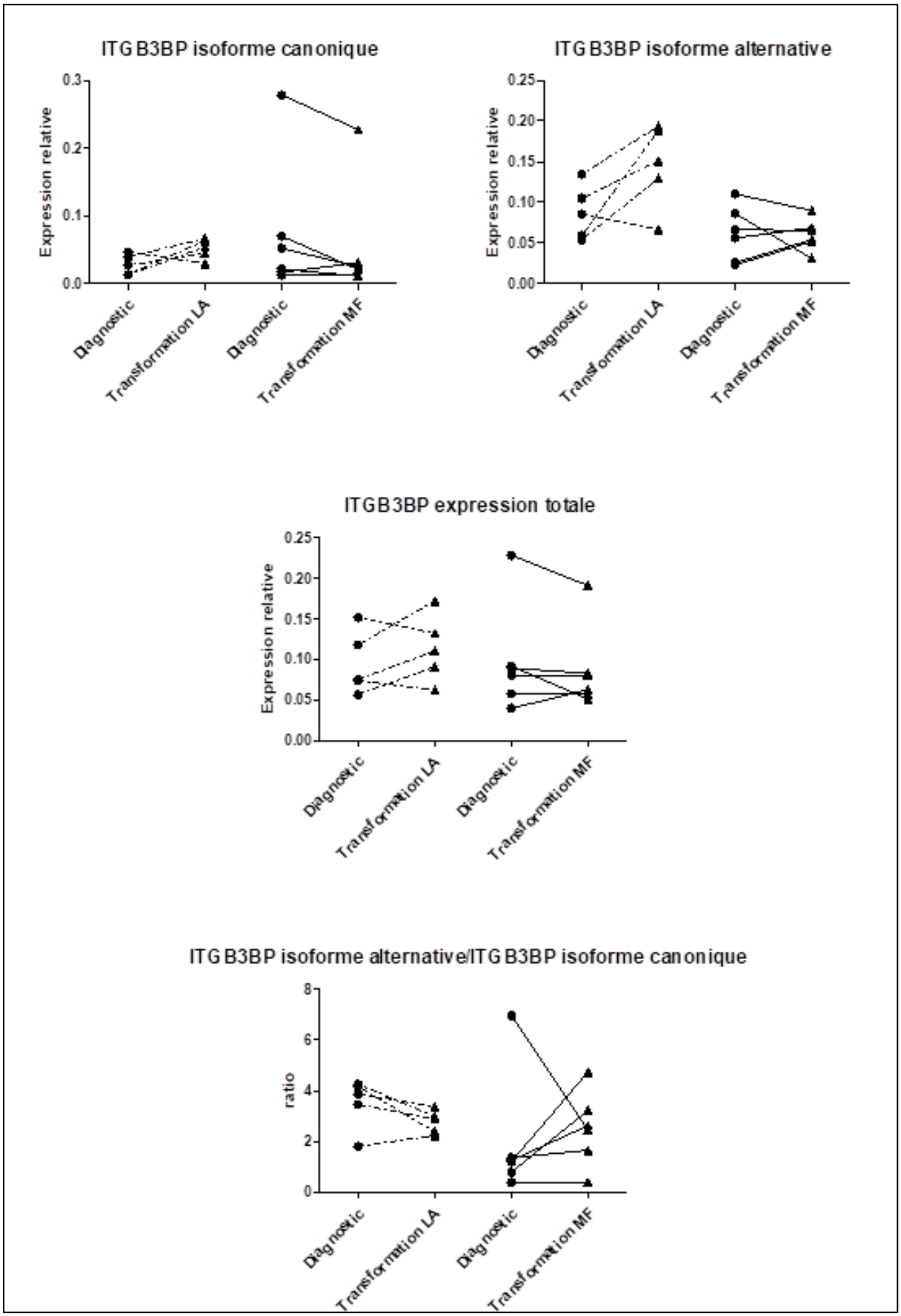

Figure 18 : Expression relative globale d'*ITGB3BP*, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP au diagnostic puis lors de la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë myéloïde.

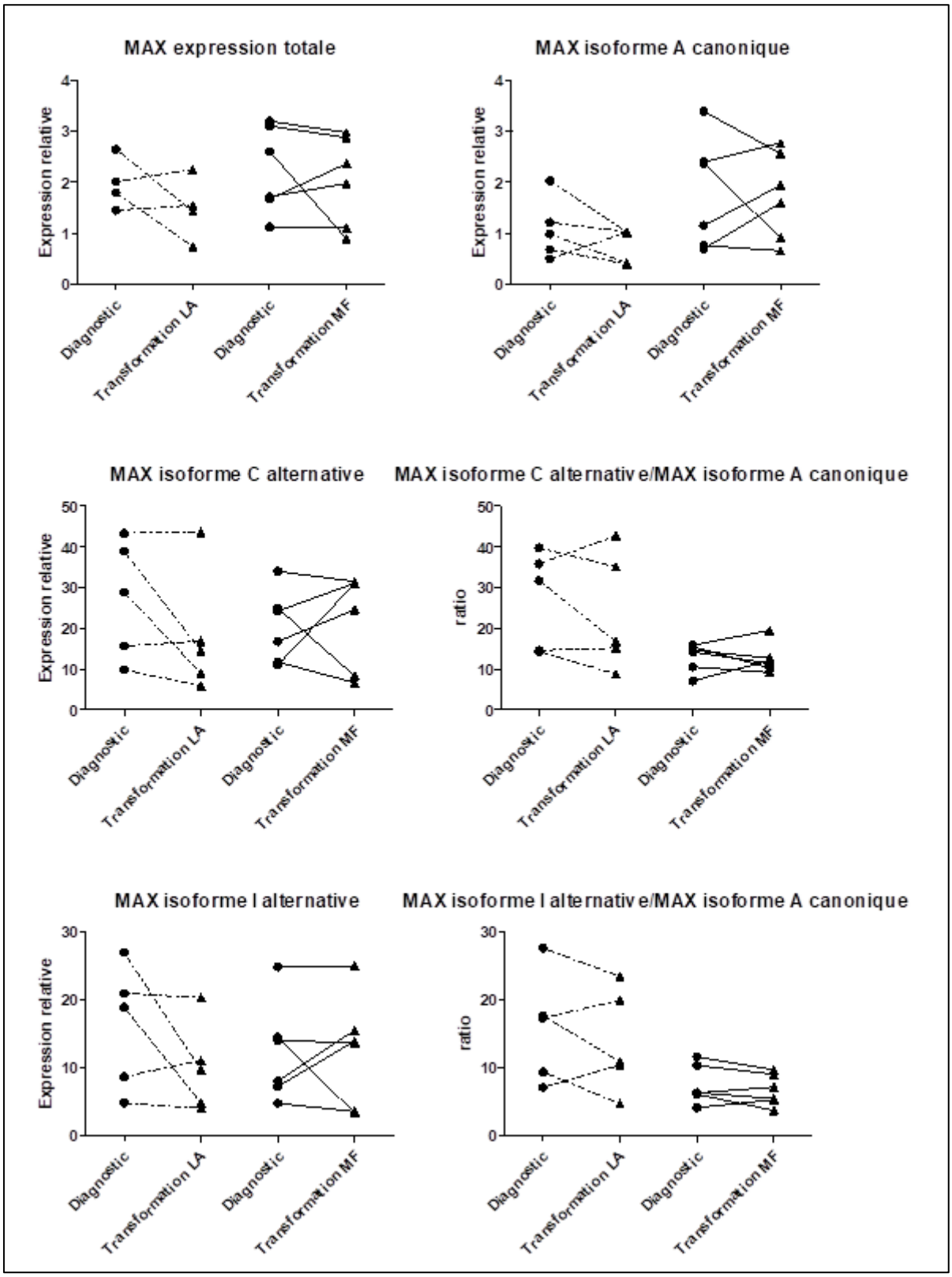

Figure 19 : Expression relative globale de *MAX*, des différents isoformes et du ratio de celles-ci chez des patients NMP au diagnostic puis lors de la transformation en myélofibrose secondaire ou en leucémie aiguë myéloïde.

	CCL2		*CCRL2*		*CCL4*		*SAT1*		*CD69*	
	moyenne	variation	moyenne	variation	moyenne	variation	moyenne	variation	moyenne	variation
Diagnostic	0,43	↓	2,20	↓	15,35	↓	12,89	↓	1,34	→
Leucémie aiguë	0,03		0,25		3,55		3,07		0,82	
Diagnostic	0,43	↓	2,99	↓	42,33	↓	28,70	→	3,20	↓
Myélofibrose secondaire	0,19		1,87		12,44		25,04		1,52	
*IDH2*R140Q-	0,06	↑	1,83	↓	12,49	↓	15,49	→	1,07	→
*IDH2*R140Q+	0,24		0,81		6,45		10,38		1,31	

Table 2 : Tableau récapitulatif des modifications d'expression

	MAX isoforme C / *MAX* isoforme A		*MAX* isoforme I / *MAX* isoforme A		*ITGB3BP* isoforme alternative / *ITGB3BP* isoforme canonique	
	moyenne	variation	moyenne	variation	moyenne	variation
Diagnostic	27,26	→	15,84	→	3,52	↓
Leucémie aiguë	23,71		13,92		2,78	
Diagnostic	12,99	→	7,50	→	2,00	→
Myélofibrose secondaire	12,55		6,78		2,52	
*IDH2*R140Q-	24,68	→	13,69	→	2,23	→
*IDH2*R140Q+	19,41		11,67		2,41	

Table 3 : Tableau récapitulatif des modifications d'épissage

IV. Discussion

Les néoplasies myéloprolifératives sont des hémopathies malignes dans lesquelles peu de données sont disponibles sur les modifications d'expression et d'épissage. Dans ce travail, nous avons cherché à valider, dans des cellules primaires de patients, des évènements observés dans un modèle cellulaire exprimant la mutation canonique *JAK2*V617F ainsi que la mutation additionnelle *IDH2*R140Q. Puis, nous avons poursuivi les analyses en comparant des patients atteints de néoplasies myéloprolifératives en phase chronique puis en phase évoluée, afin de mettre en évidence un éventuel biomarqueur d'acutisation.

A. Validation du modèle *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q

Dans le modèle cellulaire il avait été mis en évidence une sous-expression de *CCL2*, *CD69*, *CCRL2* et *SAT1* à J7 et une sur-expression à J14 ; ainsi qu'une surexpression de *CCL4* à J7 comme à J14. Nous n'avons pas mis en évidence de modifications significatives dans les cellules primaires de patients présentant la mutation *IDH2*R140Q par rapport à celles ne présentant pas cette mutation additionnelle. De plus, si on s'intéresse aux différentes tendances, nous ne retrouvons pas dans les cellules primaires de patients, de profil superposable à l'un ou l'autre des deux temps d'induction. Toutefois, nos analyses ont été réalisées sur très peu de patients (4 patients présentant la mutation et 4 patients appariés). La puissance des tests statistiques est donc extrêmement faible, ce qui explique l'absence de significativité. Les analyses devront donc être poursuivies sur un nombre plus important de patients avant de parvenir à une conclusion concernant les modifications d'expression de ces gènes cibles. De plus, la présence de la mutation *IDH2*R140Q a été confirmée par analyse NGS dans le groupe muté, alors que son absence n'est que supposée dans le groupe contrôle sur des bases statistiques, la fréquence retrouvée dans une cohorte de 133 patients présentant une polyglobulie de Vaquez étant de 2% (63). Il sera donc important lors de la poursuite des analyses, de vérifier cette absence de mutation par technique HRM.

Pour ce qui est des évènements d'épissage, l'équipe avait mis en évidence un ratio en faveur de l'isoforme canonique A de *MAX* à J7 et en faveur des isoformes alternatives C et I de *MAX* à J14 ; ainsi qu'une diminution de l'isoforme alternative *d'ITGB3BP* à J7 comme à J14. Nous n'avons pas mis en évidence de modifications d'épissage concernant *MAX* comme *ITGB3BP*, les ratios restent stables ; avec cependant les mêmes limites que celles exprimées précédemment, relatives au faible effectif de patients.

Pour conclure sur cet aspect validation du modèle cellulaire, bien que les tendances observées pour les cibles d'expression ne se rapprochent pas strictement d'une des conditions d'induction de notre modèle cellulaire, celles-ci sont bien présentes et incitent à poursuivre dans l'étude de ces cibles d'expression sur un plus grand nombre de patients.
Par contre, à la vue de ces premiers résultats il semble moins pertinent de poursuivre dans l'étude des évènements d'épissage.

B. Recherche d'un potentiel biomarqueur de transformation

De manière générale, on observe une diminution d'expression des différents gènes cibles chez les patients en phase acutisée par rapport à ces mêmes patients lors du diagnostic. Plus précisément, nous remarquons une tendance proche de la significativité dans l'expression de *CCL2* entre les patients au diagnostic et ces mêmes patients lors de la transformation en leucémie aiguë. Il en va de même pour *SAT1*. Il faut toutefois modérer ces observations, celles-ci semblant en grande partie liées à un patient qui modifierait l'expression globale du groupe. Les analyses devront être poursuivies sur un plus grand nombre de patients afin de confirmer ou non ces cibles d'expression comme des marqueurs d'intérêt. Nous n'avons pas observé de différences d'expression au niveau de *CCRL2*, *CD69* ou *CCL4* ; ni au niveau des évènements d'épissage relatifs à *MAX* et *ITGB3BP*.
Il est intéressant de noter que le profil des patients au moment de la transformation en leucémie aiguë est globalement superposable à celui des patients *IDH2*R140Q au diagnostic. En effet, comme évoqué précédemment, les mutations d'*IDH2* étant fréquemment associées à un risque plus élevé d'acutisation il est concordant de retrouver des profils moléculaires similaires entre ces deux groupes.

En ce qui concerne les transformations en myélofibrose secondaire, on observe une différence significative pour *CCL4*, avec une expression relative plus élevée au diagnostic. D'après les banques de données transcriptomiques, *CCL4* est majoritairement exprimé au niveau des lymphocytes, mais est également retrouvé au niveau des cellules myéloïdes médullaires. Les numérations-formules sanguines, notamment le pourcentage lymphocytaire, et le type de cellules analysées étant similaires, il semble intéressant de s'intéresser plus avant à cet évènement : une population cellulaire myéloïde serait-elle responsable de cette modification ? Une population cellulaire myéloïde, émanant du clone malin pourrait être responsable de cette augmentation et indiquer une tendance à la fibrose, en lien avec le potentiel pro-inflammatoire de *CCL4*. Il serait donc intéressant de mener ces mêmes analyses sur des cellules médullaires et de comparer l'expression de *CCL4* au diagnostic chez des patients présentant une évolution en myélofibrose secondaire, versus des patients ne présentant pas d'évolution. Une telle analyse, si elle s'avérait concordante avec les premières tendances observées, nous rapprocherait d'un potentiel bio-marqueur du risque de fibrose.

V. Conclusion

Les néoplasies myéloprolifératives sont des hémopathies acquises, clonales, suite à l'apparition d'une mutation driver dans une cellule souche hématopoïétique. L'accumulation de mutations secondaires, notamment celle d'*IDH2*R140Q, est fréquemment associée à la transformation leucémique. Lors de ces phases avancées il a été démontré des modifications d'expression et d'épissage de certains gènes.

Nous avons cherché à valider un modèle cellulaire exprimant une mutation driver des néoplasies myéloprolifératives ainsi qu'une mutation de haut risque associée à la transformation. Nous avons sélectionné 7 gènes d'intérêt pour la leucémogenèse et avons, grâce à des PCR quantitatives, analyser les modifications d'expression et d'épissage dans des cellules primaires de patients. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de différences significatives mais les tendances se dégageant au niveau des modifications d'expression semblent confirmer la pertinence de ces cibles. Les résultats seront à affiner sur de nouveaux prélèvements afin de pallier au faible effectif.

Puis, nous avons recherché un potentiel biomarqueur de transformation des néoplasies myéloprolifératives parmi ces mêmes 7 gènes d'intérêt. Au regard de l'acutisation en leucémie aiguë, aucun marqueur tant au niveau de l'expression que de l'épissage, n'est sorti de nos analyses. Par contre, s'agissant de la transformation en myélofibrose secondaire, il semblerait que *CCL4* soit un candidat potentiel. En effet, nous avons observé une expression élevée de *CCL4* au diagnostic chez des patients qui ont par la suite, évolué en myélofibrose. Il faut poursuivre les investigations sur un plus grand nombre de patients, en comparant notamment des patients ayant évolué à des patients n'évoluant pas, afin de statuer sur le caractère discriminant de cette modification d'expression ; et de déterminer si cette sur-expression pourrait être interprétée comme un bio-marqueur de fibrose dans les néoplasies myéloprolifératives.

VI. Bibliographie

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391–405.

2. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rorke M, Mesa R, De Vocht F, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. Am J Hematol. 2014 Jun;89(6):581–7.

3. Marchioli R, Finazzi G, Landolfi R, Kutti J, Gisslinger H, Patrono C, et al. Vascular and Neoplastic Risk in a Large Cohort of Patients With Polycythemia Vera. J Clin Oncol. 2005 Apr 1;23(10):2224–32.

4. Rungjirajittranon T, Owattanapanich W, Ungprasert P, Siritanaratkul N, Ruchutrakool T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. BMC Cancer. 2019 Dec;19(1):184.

5. Casini A, Fontana P, Lecompte TP. Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: risk assessment and risk-guided management. J Thromb Haemost. 2013;11(7):1215–27.

6. Masarova L, Bose P, Daver N, Pemmaraju N, Newberry KJ, Manshouri T, et al. Patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera differ from patients with primary myelofibrosis. Leuk Res. 2017 Aug;59:110–6.

7. Dunbar AJ, Rampal RK, Levine R. Leukemia secondary to myeloproliferative neoplasms. Blood. 2020 Jul 2;136(1):61–70.

8. Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell. 2008 Dec 4;3(6):625–36.

9. Yvernogeau L, Gautier R, Petit L, Khoury H, Relaix F, Ribes V, et al. In vivo generation of haematopoietic stem/progenitor cells from bone marrow-derived haemogenic endothelium. Nat Cell Biol. 2019 Nov;21(11):1334–45.

10. Velten L, Haas SF, Raffel S, Blaszkiewicz S, Islam S, Hennig BP, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. Nat Cell Biol. 2017 Apr;19(4):271–81.

11. Mead AJ, Mullally A. Myeloproliferative neoplasm stem cells. Blood. 2017 Mar 23;129(12):1607–16.

12. Signalisation cellulaire et cancer. Bases biologiques de la cancérologie 2e édition - Jacques Robert [Internet]. [cited 2021 Sep 2]. Available from: https://www.decitre.fr/livres/signalisation-cellulaire-et-cancer-9782257207081.html

13. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. Trends Mol Med. 2005 Dec;11(12):546–54.

14. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973 Jun 1;243(5405):290–3.

15. James C, Ugo V, Couédic J-PL, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature. 2005 Apr;434(7037):1144–8.

16. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. The Lancet. 2005 Mar 19;365(9464):1054–61.

17. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. Cancer Cell. 2005 Apr 1;7(4):387–97.

18. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. N Engl J Med. 2005 Apr 28;352(17):1779–90.

19. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 Exon 12 Mutations in Polycythemia Vera and Idiopathic Erythrocytosis. N Engl J Med. 2007 Feb 1;356(5):459–68.

20. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. Haematologica. 2017 Jan;102(1):7–17.

21. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2013 Dec 19;369(25):2379–90.

22. Fyodorov DV, Zhou B-R, Skoultchi AI, Bai Y. Emerging roles of linker histones in regulating chromatin structure and function. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Mar;19(3):192–206.

23. Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. C R Biol. 2016 Jul 1;339(7):225–30.

24. McPherson S, McMullin MF, Mills K. Epigenetics in Myeloproliferative Neoplasms. J Cell Mol Med. 2017 Sep;21(9):1660–7.

25. Dang L, Yen K, Attar EC. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. Ann Oncol. 2016 Apr 1;27(4):599–608.

26. Rinke J, Chase A, Cross NCP, Hochhaus A, Ernst T. EZH2 in Myeloid Malignancies. Cells. 2020 Jul 8;9(7):1639.

27. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. Blood. 2017 Feb 9;129(6):667–79.

28. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia. 2013 Sep;27(9):1861–9.

29. Zhang S-J, Rampal R, Manshouri T, Patel J, Mensah N, Kayserian A, et al. Genetic analysis of patients with leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms shows recurrent SRSF2 mutations that are associated with adverse outcome. Blood. 2012 May 10;119(19):4480–5.

30. Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R, et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. N Engl J Med. 2018 Oct 11;379(15):1416–30.

31. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. Nature. 2012 Feb 15;483(7390):474–8.

32. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. Hematology. 2014 Dec 5;2014(1):287–96.

33. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. Leukemia. 2010 Jul;24(7):1302–9.

34. McManus CJ, Graveley BR. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. Curr Opin Genet Dev. 2011 Aug;21(4):373–9.

35. Sperling J, Azubel M, Sperling R. Structure and function of the Pre-mRNA splicing machine. Struct Lond Engl 1993. 2008 Nov 12;16(11):1605–15.

36. Verma B, Akinyi MV, Norppa AJ, Frilander MJ. Minor spliceosome and disease. Semin Cell Dev Biol. 2018 Jul 1;79:103–12.

37. Kornblihtt AR, Schor IE, Alló M, Dujardin G, Petrillo E, Muñoz MJ. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2013 Mar;14(3):153–65.

38. Hautin M, Mornet C, Chauveau A, Bernard D, Corcos L, Lippert E. Splicing Anomalies in Myeloproliferative Neoplasms: Paving the Way for New Therapeutic Venues. Cancers. 2020 Aug 7;12(8).

39. Sanford JR, Ellis J, Cáceres JF. Multiple roles of arginine/serine-rich splicing factors in RNA processing. Biochem Soc Trans. 2005 Jun 1;33(3):443–6.

40. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature. 2011 Oct;478(7367):64–9.

41. Calabrese C, Davidson NR, Demircioğlu D, Fonseca NA, He Y, Kahles A, et al. Genomic basis for RNA alterations in cancer. Nature. 2020 Feb;578(7793):129–36.

42. Holm F, Hellqvist E, Mason CN, Ali SA, Delos-Santos N, Barrett CL, et al. Reversion to an embryonic alternative splicing program enhances leukemia stem cell self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Dec 15;112(50):15444–9.

43. Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblihtt AR, Misteli T. Epigenetics in Alternative Pre-mRNA Splicing. Cell. 2011 Jan 7;144(1):16–26.

44. Adamia S, Haibe-Kains B, Pilarski PM, Bar-Natan M, Pevzner S, Avet-Loiseau H, et al. A Genome-Wide Aberrant RNA Splicing in Patients with Acute Myeloid Leukemia Identifies Novel Potential Disease Markers and Therapeutic Targets. Clin Cancer Res. 2014 Mar 1;20(5):1135–45.

45. Anande G, Deshpande NP, Mareschal S, Batcha AMN, Hampton HR, Herold T, et al. RNA Splicing Alterations Induce a Cellular Stress Response Associated with Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. Clin Cancer Res. 2020 Jul 15;26(14):3597–607.

46. Li D, Desai-Yajnik V, Lo E, Schapira M, Abagyan R, Samuels HH. NRIF3 Is a Novel Coactivator Mediating Functional Specificity of Nuclear Hormone Receptors. Mol Cell Biol. 1999 Oct;19(10):7191–202.

47. Okumura K, Kagawa N, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, et al. CENP-R acts bilaterally as a tumor suppressor and as an oncogene in the two-stage skin carcinogenesis model. Cancer Sci. 2017 Nov;108(11):2142–8.

48. Li D, Das S, Yamada T, Samuels HH. The NRIF3 Family of Transcriptional Coregulators Induces Rapid and Profound Apoptosis in Breast Cancer Cells. Mol Cell Biol. 2004 May;24(9):3838–48.

49. Yamashita T, Higashi M, Momose S, Adachi A, Watanabe T, Tanaka Y, et al. Decreased MYC-associated factor X (MAX) expression is a new potential biomarker for adverse prognosis in anaplastic large cell lymphoma. Sci Rep. 2020 Jun 25;10(1):10391.

50. Kemmerer K, Weigand JE. Hypoxia reduces MAX expression in endothelial cells by unproductive splicing. FEBS Lett. 2014;588(24):4784–90.

51. Babic I, Anderson ES, Tanaka K, Guo D, Masui K, Li B, et al. EGFR mutation-induced alternative splicing of Max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. Cell Metab. 2013 Jun 4;17(6):1000–8.

52. Gschwandtner M, Derler R, Midwood KS. More Than Just Attractive: How CCL2 Influences Myeloid Cell Behavior Beyond Chemotaxis. Front Immunol. 2019 Dec 13;10:2759.

53. Lubowicka E, Przylipiak A, Zajkowska M, Piskór BM, Malinowski P, Fiedorowicz W, et al. Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients. BioMed Res Int. 2018 Jul 30;2018:2124390.

54. Tsaur I, Noack A, Makarevic J, Oppermann E, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. CCL2 Chemokine as a Potential Biomarker for Prostate Cancer: A Pilot Study. Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc. 2015 Apr;47(2):306–12.

55. Yazdani Z, Mousavi Z, Ghasemimehr N, Kalantary Khandany B, Nikbakht R, Jafari E, et al. Differential regulatory effects of chemotherapeutic protocol on CCL3_CCL4_CCL5/CCR5 axes in acute myeloid leukemia patients with monocytic lineage. Life Sci. 2020 Jan 1;240:117071.

56. Zhang B, Ho YW, Huang Q, Maeda T, Lin A, Lee S, et al. Altered microenvironmental regulation of leukemic and normal stem cells in chronic myelogenous leukemia. Cancer Cell. 2012 Apr 17;21(4):577–92.

57. Cibrián D, Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. Eur J Immunol. 2017 Jun;47(6):946–53.

58. Huang S-Y, Liu Y-H, Chen Y-J, Yeh Y-Y, Huang H-M. CD69 partially inhibits apoptosis and erythroid differentiation via CD24, and their knockdown increase imatinib sensitivity in BCR-ABL-positive cells. J Cell Physiol. 2018;233(9):7467–79.

59. Ou Y, Wang S-J, Li D, Chu B, Gu W. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Nov 1;113(44):E6806–12.

60. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. Nat Protoc. 2006;1(2):581–5.

61. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. Leukemia. 2003 Dec;17(12):2318–57.

62. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif. 2001 Dec;25(4):402–8.

63. Tefferi A, Lasho TL, Guglielmelli P, Finke CM, Rotunno G, Elala Y, et al. Targeted deep sequencing in polycythemia vera and essential thrombocythemia. Blood Adv. 2016 Nov 29;1(1):21–30.

Annexes

Numéro	Sexe	Date de naissance	Date de diagnostic	Pathologie	Date de prélèvement	Stade pathologie	Cellules analysées	Hb (g/dL)	Plaquettes (G/L)	GB (G/L)	PNN		PNE		PNB		Lymphocytes		Monocytes		Myélémie	Blastes
											%	G/L	%	G/L	%	G/L	%	G/L	%	G/L	%	%
5968	H	21/06/1941	27/06/2006	MFP *JAK2* V617F	21/04/2011	Chronique	Leucocytes totaux	8,9	250	5,3	65	3,445	1	0,053	1	0,053	23,5	1,2455	5	0,265	4	-
					13/04/2016	Transformation (LAM)	Leucocytes totaux	9,7	70	23,1	20	4,62	0,5	0,12	2	0,46	8,5	1,96	46,5	10,74	8,5	12,5
1919	F	10/03/1935	06/10/2004	PV *JAK2* V617F	18/11/2014	Chronique	PNN sang	14,3	395	6	77	4,62	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	0,5	-
					05/06/2016	Transformation (LAM)	Leucocytes totaux	8,6	149	2,2	60,5	1,32	1	0,02	2	0,04	19,5	0,43	6	0,13	0,5	10,5
3755	H	26/04/1934	NC	MFP *JAK2* V617F	12/02/2008	Chronique	Leucocytes totaux	15,4	361	23,39	89	20,8171	2	0,4678	0	0	2,5	0,5847	1,5	0,3508	4	0,5
					22/04/2014	Transformation (LAM)	Leucocytes totaux	9,4	135	8,3	20,5	1,7015	0,5	0,0415	0,5	0,0415	10	0,83	5	0,415	51,5	11
4311	H	01/11/1949	12/12/2008	TE *JAK2* V617F	12/12/2008	Diagnostic	Leucocytes totaux	15,6	568	6,06	60,5	3,6663	7	0,4242	0,5	0,0303	26	1,5756	5,5	0,3333	0,5	-
					01/12/2020	Transformation (AREB	Leucocytes totaux	13,3	454	19,7	70	13,76	3,5	0,69	1,5	0,29	6,5	1,28	8,5	1,67	5	5
3998	H	17/09/1955	23/06/2008	TE *CALR*	23/06/2008	Diagnostic	Leucocytes totaux	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*
					22/01/2016	Transformation (MF)	Leucocytes totaux	12,2	293	9,5	67,5	6,43	0	0	0	0	18	1,72	9,5	0,91	4	1
2595	H	04/02/1953	01/01/2006	PV *JAK2* V617F	01/06/2006	Diagnostic	Leucocytes totaux	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*
					28/09/2010	Transformation (MF)	Leucocytes totaux	11,2	172	14,1	89,5	12,6195	0,5	0,0705	0	0	7	0,987	1,5	0,2115	1,5	-
9121	H	11/01/1971	12/05/2015	PV *JAK2* V617F	15/05/2015	Diagnostic	Leucocytes totaux	18,1	778	16,8	78	13,14	2,5	0,42	0,5	0,08	14	2,36	5	0,84	-	-
					25/10/2017	Transformation (MF)	Leucocytes totaux	12,8	613	14,4	82	11,78	0	0	3	0,43	12,5	1,8	2,5	0,36	-	-
4948	F	08/02/1947	03/01/2010	TE *JAK2* V617F	05/03/2013	Chronique	Leucocytes totaux	11,7	414	5,9	75,5	4,4545	1	0,059	0	0	18	1,062	5,5	0,3245	-	-
					11/09/2018	Transformation (MF)	Leucocytes totaux	9,4	456	4,7	81,9	3,87	2	0,09	0	0	11,6	0,55	4,5	0,21	-	-
3956	H	20/05/1933	17/10/2008	PV *JAK2* V617F	27/04/2009	Chronique	Leucocytes totaux	14,7	341	12,5	77	9,625	0	0	1	0,125	19,5	2,4375	2,5	0,3125	-	-
					21/05/2019	Transformation (MF)	Leucocytes totaux	11,9	422	9,3	78,5	7,32	1,5	0,14	2	0,19	11	1,03	4,5	0,42	2	0,5
3316	F	23/05/1944	09/01/1999	PV *JAK2* V617F	11/03/2009	Chronique	Leucocytes totaux	14,6	205	5,3	84	4,452	2	0,106	1	0,053	9	0,477	4	0,212	-	-
					20/02/2017	Transformation (MF)	Leucocytes totaux	13,5	518	11,1	84,5	9,38	1	0,11	1	0,11	10	1,11	3,5	0,39		
4204	H	18/11/1953	12/06/2009	PV *JAK2* V617F *IDH2* R140Q	12/06/2009	Diagnostic	Leucocytes totaux	13,1	262	17,5	97	16,975	0,5	0,0875	1	0,175	0,5	0,0875	1	0,175	-	-
5990	H	29/04/1953	05/05/2011	PV *JAK2* V617F	05/05/2011	Diagnostic	Leucocytes totaux	16,1	610	8,9	60,5	5,3845	5	0,445	2,5	0,2225	28	2,492	4	0,356	-	-
4960	F	21/03/1921	22/12/2009	PV *JAK2* V617F *IDH2* R140Q	22/12/2009	Diagnostic	Leucocytes totaux	16,2	730	10,2	71	7,242	0,5	0,051	0,5	0,051	19,5	1,989	8,5	0,867	-	-
10369	H	15/03/1928	12/08/2016	PV *JAK2* V617F	08/12/2016	Diagnostic	Leucocytes totaux	13,8	993	19,4	81	15,75	6,5	1,26	1	0,19	4,5	0,88	6	1,17	0,5	-
12990	F	22/07/1935	16/09/2020	PV *JAK2* V617F *IDH2* R140Q	16/09/2020	Diagnostic	Leucocytes totaux	10,1	1426	8,6	89,2	7,63	0,9	0,08	0	0	8,1	0,69	0,9	0,08	0,9	-
4998	F	01/02/1932	2010 ?	MFP *JAK2* V617F	12/01/2010	Diagnostic	Leucocytes totaux	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*	*NC*
4252	H	17/11/1934	19/11/2008	PV *JAK2* V617F *IDH2* R140Q	19/11/2008	Diagnostic	Leucocytes totaux	15,7	748	7,15	56,5	4,0398	3,5	0,2503	5,5	0,3933	21	1,5015	13	0,9295	0,5	-
					11/09/2015	Transformation (LAM/SMD)	Leucocytes totaux	12,6	397	3,3	50	1,65	1	0,03	3	0,1	28,5	0,94	13,5	0,45	-	3,5

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des patients inclus

	Température	Temps (min)	
Dénaturation	95°C	10:00	
Amplification	95°C	00:15	**40 cycles**
	60°C	01:00	
Courbe de fusion	95°C	00:15	
	60°C	01:00	
	95°C	00:15	

Annexe 2 : Programme de qPCR

	Amorces	**Concentration**	**Séquence**	
Contrôle endogène	GAPDH	300 nM	F : GAGTCAACGGATTTGGTCGT	
		300 nM	R : TTGATTTTGGAGGGATCTCG	
Expression	CD69	900 nM	F : GACTGGGTTGGCTACCAGAG	
		300 nM	R : TGACCACTTCCATGGGTGAC	
	CCL2	300 nM	F : GATCTCAGTGCAGAGGCTCG	
		900 nM	R : AACAGGGTGTCTGGGGAAAG	
	CCRL2	300 nM	F : TTGGACTGTACTTCGTGGGC	
		300 nM	R : TGTTACCCATGCCAGGACAC	
	CCL4	900 nM	F : GCTTCCTCGCAACTTTGTGG	
		300 nM	R : TCACTGGGATCAGCACAGAC	
	SAT1	300 nM	F : CTGGACTCCGGAAGGACACA	
		300 nM	R : CACCTCATTGCAACCTGGCT	**Evènement d'épissage**
Anomalies d'épissage	MAX_2	300 nM	F : CTGGGCCGTAGGAAATGAGC	Forme globale
		300 nM	R : CCCGCAAACTGTGAAAGCTG	
	MAX_3	300 nM	F : CGACCTCAAGCGGCAGAATG	Forme C alternative
		300 nM	R : CGGACCAGGTGGTTACTTGC	
	MAX_4	300 nM	F : CATCCCGGGCCCAAATCCT	Forme A canonique
		300 nM	R : GTGCACGGACTTGCTGCTCC	
	MAX_5	300 nM	F : GACCTCAAGCGGCAGAATG	Forme I alternative
		300 nM	R : GTGCACGGAATTTCCTTTTAC	
	ITGB3BP_2	300 nM	F : TCACTGAAGTTGGATGGTCTGT	Forme globale
		300 nM	R : TCAGAACTTGTGGGAGAAGCA	
	ITGB3BP_3	300 nM	F : GCTTTGGAGGGCAGTAGAGA	Inclusion de l'exon 10
		300 nM	R : GGGAGAGCTTCACAGAGGTT	
	ITGB3BP_4	300 nM	F : GCTTTGGAGGGCAGTAGAGA	Exclusion de l'exon 10
		300 nM	R : TGACGTGATGCTTTGTGAGG	

Annexe 3 : Amorces et concentrations utilisées

UNIVERSITÉ DE NANTES **Année de la soutenance 2021**

Nom - Prénoms : MORNET Clélia

Titre de la thèse : Dérégulation transcriptionnelle et de l'épissage dans les néoplasies myéloprolifératives.

Résumé de la thèse :

Les néoplasies myéloprolifératives sont des hémopathies clonales, acquises suite à l'apparition d'une mutation driver dans une cellule souche hématopoïétique, caractérisées par une prolifération cellulaire excessive des lignées hématopoïétiques myéloïdes sans anomalie de différenciation, et qui peuvent évoluer vers des pathologies plus graves comme la myélofibrose secondaire ou la leucémie aiguë. Ces transformations sont souvent associées à des mutations additionnelles affectant des gènes impliqués dans la régulation épigénétique et l'épissage. Ce travail a consisté à analyser, dans des cellules primaires de patients atteints de néoplasies myéloprolifératives, grâce à des PCR quantitatives, des modifications d'expression et d'épissage mises en évidence sur 7 gènes cibles dans un modèle cellulaire *JAK2*V617F/*IDH2*R140Q afin de valider celui-ci ; et dans un second temps de mettre en évidence un potentiel bio-marqueur de transformation dans ces pathologies. Premièrement, les tendances observées pour les cibles d'expression sont bien présentes et incitent à poursuivre dans l'étude de celles-ci sur un plus grand nombre de patients afin de valider le modèle. Puis, nous avons observé une sur-expression de *CCL4* au diagnostic chez des patients évoluant par la suite en myélofibrose secondaire. Cette piste encourageante devra être approfondie afin de confirmer ce potentiel bio-marqueur de fibrose.

MOTS CLÉS

NEOPLASIES MYELOPROLIFERATIVES, EPISSAGE, EPIGENETIQUE, BIOMARQUEUR, MYELOFIBROSE SECONDAIRE, LEUCEMIE AIGUE

JURY

PRESIDENTE : Mme Edith BIGOT-CORBEL, Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier de Biochimie, UFR Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nantes

ASSESSEURS : M. Hubert GALINAT, Praticien Hospitalier,CHRU de Brest

M. Cédric LE MARECHAL, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier de Génétique,UFR de Médecine de Brest

M. Eric LIPPERT, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier d'Hématologie,UFR de Médecine de Brest

---

Adresse de l'auteur : 22 boulevard Gambetta, 29200 Brest