



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année 2017

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN MEDECINE**

Les mutations de CSF3R dans les hémopathies myéloïdes

Présentée et soutenue publiquement le 28 juin 2017 à 18h00

au Pôle Formation

Par Sarah BONNET

née le 19/08/1986

JURY :

Monsieur le Professeur F. MORSCHHAUSER

Assesseurs :

Monsieur le Docteur M. WEMEAU

Madame le Docteur A. MARCEAU

Directeurs de Thèse :

Messieurs les Professeurs E. SOLARY et B. QUESNEL

La Faculté n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Table des matières :

- I) Introduction (p.9)
 - a. Contexte (p.9)
 - b. But du travail (p.11)
 - c. Plan (p.11)
- II) CSF3R (p.12)
 - a. Structure (p.12)
 - b. Fonctions du récepteur (p.16)
 - c. Les mutations de CSF3R identifiées (p.18)
 - d. Voies de signalisation (p.21)
 - i. Voie JAK STAT (p.21)
 - ii. Voie Src kinase (p.22)
 - e. Oncogénicité des mutations (p.24)
- III) Neutropénie congénitale sévère (NCS) (p.28)
 - a. Définition/présentation de la maladie (p.28)
 - b. Physiopathologie (p.28)
 - c. Traitement (p.30)
 - d. Mutations de CSF3R acquises et transformation en LAM (p.31)
- IV) Leucémie chronique à neutrophiles (LCN) (p.37)
 - a. Définition/présentation de la maladie (p.37)
 - b. Physiopathologie (p.39)
 - c. Traitement (p.39)
 - d. CSF3R et leucémogénèse / Coopération oncogénique (p.43)
- V) Leucémie myeloïde chronique atypique (LMCa) (p.43)
 - a. Définition/présentation de la maladie (p.43)
 - b. Physiopathologie (p.45)
 - c. Traitement (p.46)
- VI) Leucémie aiguë myéloblastique (LAM) (p.47)
 - a. Définition/présentation de la maladie (p.47)
 - b. Physiopathologie (p.48)

- i. LAM *de novo* (p.48)
 - ii. SMD et LAM secondaires (p.51)
- VII) Leucémie myélo-monocytaire chronique (LMMC) (p.53)
 - a. Définition/présentation de la maladie (p.53)
 - b. Physiopathologie (p.55)
 - c. Les mutations de CSF3R identifiées dans la LMMC (p.59)
- VIII) Etude des conséquences fonctionnelles des mutations de CSF3R dans la LMMC (p.60)
 - a. Projet (p.60)
 - b. Méthodes (p.61)
 - c. Résultats (p.72)
 - d. Conclusions du projet (p.83)
- IX) Conclusion/Discussion (p.86)
- X) Bibliographie (p.88)

Index des abréviations :

ACK1 : Activated Cdc42 Kinase 1
ADN : Acide désoxyribonucléique
AKT : Protéine kinase B
ASXL1: Additional sex combs like 1
ATRA : all-transretinoic acid
Ba/F3 : lignée cellulaire murine pro B dépendante de l'IL3
B2M : β 2microglobuline
BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region-Abelson
BOM : Biopsie ostéo-médullaire
CBF: Core binding Factor
CBL : Casitas B-lineage Lymphoma
CD : Cluster de différenciation
CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha
CSF3R : Colony stimulating factor 3
CRH : Cytokine receptor homology
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
DNMT3A : DNA méthyltransférase 3A
DTT : Dithiothréitol
EED : Embryonic Ectoderm Development
EPO : Erythropoïétine
ERK : Extracellular signal-regulated kinases
ETKN1: Ethanolamine kinase 1
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2
FACS : Fluorescence activated cell sorting
FAK : Focal adhesion kinase
FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3
G-CSF : Granulocyte colony stimulating factor
GFI1 : Growth Factor Independent 1
GM-CSF: Granulocyte macrophage colony stimulating factor
GUS : gene de la β -glucuronidase

HAX1 : HCLS1 Associated Protein X-1
HR : Hazard Ratio
HSP70 : Heat Shock Protein
IL8 : Interleukine 8
ITK : Inhibiteur de tyrosine kinase
JAK : Janus Kinase
KLD : Kinase ligase Dpnl
LAM : Leucémie aiguë myéloïde
LLGL2 : Lethal giant larvae homologue 2
LMC : Leucémie myéloïde chronique
LMMC : Leucémie myélomonocytaire chronique
LCN / Leucémie chronique à neutrophiles
LEF1 : Lymphoid enhancer binding factor 1
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MPL : récepteur de la thrombopoïétine
MRD : Minimal Residual Disease
NCS : Neutropénie congénitale sévère
NE : Neutrophile elastase
NF1 : neurofibromatose 1
NGS : Next generation sequencing
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase chain reaction
PDGFR : Platelet-derived growth factor
PI3K : phosphoinositide 3-kinase
PML RARA : ProMyelocytic Leukemia/Retinoic Acid Receptor
PNN : Polynucléaires neutrophiles
PPIA : Peptidylprolyl isomerase A
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PTPN11 : Tyrosine-protein phosphatase non receptor type 11
RE : Reticulum endoplasmique
RIT1 : RIC-like protein without CAAX motif

ROS : Reactive Oxygen Species
RUNX1 : runt Related Transcription Factor 1
SCNIR : Severe Chronic Neutropenia International Registry
SETBP1 : SET Binding Protein 1
SH2 : Src Homology 2
SF3B1: Splicing Factor 3B subunit 1
SFK : Src Family kinases
SMD : syndrome myélodysplasique
SMP : syndrome myéloprolifératif
SOCS : Suppressor of cytokine signaling
SRC : famille de kinases (Lck, Hck, Blk, Fyn, Fgr...)
SRSF2 : Serine Rich Splicing Factor 2
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
TET2 : Ten eleven translocation
U2AF1 : U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
UPR : Unfolded Protein Response
UTX : Ubiquitously transcribed teratricoptide repeat, X chromosome
VEGF : Vascular endothelial growth factor
WAS : Wiskott Aldrich Syndrome
WB : Western Blot
WT : Wild type (sauvage)
ZC3H18 : Zinc finger CCCH domain-containing protein 18

l) Introduction

a. Contexte

Le récepteur CSF3R (Colony Stimulating Factor 3 Receptor) ou CD114 est le récepteur du G-CSF (Granulocyte-Colony-Stimulating Factor, encore appelé CSF3), une cytokine qui contrôle la production, la différenciation et les fonctions des granulocytes, dont la plus importante est la lutte contre les infections bactériennes et fongiques.

Le G-CSF est capable de stimuler à la fois la myélopoïèse et la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques, propriété largement utilisée en clinique pour accélérer la récupération médullaire après une chimiothérapie ou pour le recueil de cellules souches hématopoïétiques (CSH) par cytophérèse avant auto ou allogreffe de CSH. Le G-CSF a aussi été utilisé dans le traitement des LAM, soit comme agent induisant la différenciation (principalement avant la découverte de l'ATRA) soit comme chimiosensibilisateur dans l'idée d'activer les cellules souches leucémiques quiescentes et de les mettre en cycle pour les rendre sensibles aux chimiothérapies. Une seule étude a montré un bénéfice à l'utilisation du G-CSF en induction (1) mais cette indication n'a pas été retenue en pratique courante. Des indications hors du champ de l'hématologie existent également : régénération myocardique après infarctus (2,3), amélioration de l'apoptose dans les neurones après un accident vasculaire cérébral, réduisant ainsi le volume de l'infarctus cérébral (4).

Des mutations somatiques du récepteur au G-CSF sont décrites dans un spectre large de pathologies myéloïdes, incluant des hémopathies malignes. Ces pathologies présentant des mutations de ce récepteur sont principalement la neutropénie congénitale sévère (NCS), considérée comme un état pré-leucémique, les néoplasmes myéloprolifératifs tels que

la leucémie chronique à neutrophiles (LCN), la leucémie myéloïde atypique (LMCa), la leucémie myélo-monocytaire chronique (LMMC) et plus rarement la leucémie aiguë myéloblastique (LAM). La recherche concernant le rôle des mutations de ce récepteur dans la leucémogénèse est en plein essor et la compréhension des processus oncogéniques impliqués dans ces pathologies est de plus en plus précise.

Les anomalies des voies de signalisation entraînant une activation constitutive du signal et aboutissant à la survie et à la prolifération cellulaire sont désormais des processus bien connus en onc-hématologie, dont l'exemple le plus simple et le plus typique en hématologie est celui de la leucémie myéloïde chronique (LMC). En effet, dans cette pathologie, la translocation acquise réciproque (9,22) (chromosome Philadelphie) entraîne l'activation d'un oncogène, sous la forme d'une activité tyrosine kinase dans la protéine de fusion induite « bcr-abl » aboutissant à une prolifération incontrôlée et permanente des cellules myéloïdes. Ce modèle est simple car la translocation est présente dans tous les cas de LMC et suffit au diagnostic. La révolution thérapeutique dans le champ de cette pathologie a vu le jour avec l'arrivée des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) (5,6) permettant le blocage de ce processus oncogénique. De façon plus générale, l'activation constitutive de tyrosine kinases et des voies de signalisation en aval constitue le mécanisme princeps des syndromes myéloprolifératifs. Outre le modèle de la LMC sus-décrit, les mutations de JAK2 V617F dans la polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive, les mutations de KIT D816V dans la mastocytose systémique et les néoplasmes myéloïdes avec réarrangement de PDGFRA/B avec éosinophilie entraînent une activation pathologique de voies de survie et sont sensibles aux thérapies inhibitrices ciblées.

Les syndromes myéloprolifératifs où l'on détecte des mutations de CSF3R, dits atypiques, concernent principalement deux hémopathies : la LMCa et

la LCN. Ces dernières ne relèvent pas de mécanismes oncogéniques uniques et aussi bien compris que ceux évoqués dans le paragraphe précédent, mais il semble que des mutations, dont celles de CSF3R, pourraient entraîner des phénomènes d'activation constitutive comparables et être sensibles à des inhibiteurs de voies de signalisation plus ou moins ciblés.

De nouvelles cibles thérapeutiques sont indispensables dans ces pathologies au pronostic sombre pour lesquelles l'arsenal thérapeutique est extrêmement limité. La détection des mutations de CSF3R pourrait permettre de proposer aux patients atteints de ces SMP atypiques des thérapies ciblées en fonction du type de mutations présent. Une des mutations de CSF3R que nous reverrons en détail vient d'ailleurs d'être incluse dans les critères diagnostiques de la LCN dans la nouvelle classification OMS 2016 (7). Des modèles murins ont montré une efficacité du Ruxolitinib (8) chez les souris exprimant le récepteur avec cette mutation et un essai clinique de phase 2 est en cours chez l'homme (NCT02092324).

b. But du travail

Le but de la première partie de ce travail de thèse est d'analyser la fréquence et le rôle des mutations de CSF3R dans les hémopathies myéloïdes, de déterminer s'il y a une indication à les rechercher et surtout si ces mutations sont ciblables par des thérapeutiques.

Dans un deuxième temps, je présenterai des travaux d'analyse fonctionnelle des mutations de CSF3R identifiées dans la LMMC réalisés au laboratoire de recherche de l'Institut Gustave Roussy.

c. Plan

Après avoir présenté la structure du récepteur, ses différentes isoformes et ses fonctions, nous passerons en revue les pathologies dans lesquelles ce récepteur est muté et nous verrons qu'il existe deux grands types de mutations avec des conséquences fonctionnelles bien définies. La stratégie de ciblage sera différente selon le mécanisme mis en jeu, bien qu'il existe des situations où les deux mutations coexistent. La dernière partie s'attachera à présenter les expériences réalisées à l'Institut Gustave Roussy avec des expériences de clonage pour réaliser des mutagenèses dirigées puis l'étude des conséquences fonctionnelles, notamment sur la prolifération et l'indépendance au G-CSF, sur des lignées et sur des progéniteurs hématopoïétiques CD34+.

II) CSF3R

a. Structure

Le récepteur au G-CSF appartient à la superfamille des récepteurs de cytokine de type I. Il est constitué d'une chaîne polypeptidique unique. La fixation du ligand sur son récepteur provoque la formation d'homodimères : la stœchiométrie du récepteur activé est 2:2 (deux molécules de G-CSF pour deux chaînes polypeptidiques). Ce récepteur n'a pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque mais c'est le changement de conformation secondaire à la liaison du ligand sur son récepteur qui stimule les tyrosines kinases associées à son domaine cytoplasmique.

Le gène humain codant le récepteur au G-CSF, que l'on appelle *CSF3R*, est localisé en 1p32-34. Il existe 4 isoformes issues d'un épissage alternatif du transcrit primaire de 3.7kb.

- La plus abondante est l'isoforme I qui code une protéine de 130 kDa fortement glycosylée.

- L'isoforme II coderait une protéine dépourvue de domaine transmembranaire et sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme de récepteur soluble.
- Les isoformes III et IV codent des protéines qui diffèrent de l'isoforme I par la taille de leur domaine cytoplasmique. Dans l'isoforme IV, les 87 acides aminés C-terminaux qui jouent un rôle central dans la différenciation granulocytaire sont remplacés par une séquence de 34 autres acides aminés de fonction encore inconnue. Cette isoforme, qui présente donc des défauts de différenciation et de signalisation, ne serait exprimée que dans des cellules transformées, en particulier dans les cellules de leucémie aiguë myéloïde et serait un facteur de chimiorésistance (9,10).

Cette isoforme IV, retrouvée dans les LAM, est associée à la présence d'une monosomie du chromosome 7 et à une augmentation du risque de rechutes (11). Par ailleurs, il a été montré que le G-CSF stimule préférentiellement les cellules exprimant l'isoforme IV et ayant une monosomie du chromosome 7, promouvant ainsi l'expansion de ce clone (12). Par ailleurs, l'expression de miR-155 semble associée au potentiel leucémogène de l'isoforme IV dans les progéniteurs CD34+ qui présentent une prolifération accrue et une résistance à l'apoptose (13).

Des mutations du spliceosome entraînent un épissage alternatif de CSF3R, certaines mutations comme SF3B1 augmentent le taux d'isoforme IV tandis que d'autres mutations telles que U2AF1 le diminuent. Les mutations du spliceosome sont associées à des altérations de CSF3R et affectent les voies de signalisation en aval du récepteur (14).

Dans le système hématopoïétique, le récepteur est exprimé à la surface des cellules souches pluripotentes, des précurseurs granulocytaires, des polynucléaires neutrophiles, des promonocytes, des monocytes et des macrophages.

En dehors du système hématopoïétique normal, ce récepteur est exprimé à la surface des cellules endothéliales, des cellules placentaires, des cellules trophoblastiques et des cellules tumorales : blastes de leucémies myéloïdes, cellules de cancer de la vessie et de cancer bronchique à petites cellules.

En revanche, on ne détecte pas de récepteur du G-CSF à la surface des lymphocytes (sauf quelques rares lignées de lymphocytes B ou T), des polynucléaires éosinophiles et des précurseurs érythrocytaires.

L'isoforme I de CSF3R est une protéine de 130 à 150 kDa composée de 836 acides aminés répartis en cinq domaines (Figure 1) :

- un motif immunoglobuline de 90 acides aminés.
- un domaine CRH « récepteur de cytokines » de 210 acides aminés.
- une répétition de trois motifs « fibronectine » de type III.
- un domaine transmembranaire de 26 acides aminés.
- un domaine intracellulaire de 183 acides aminés assurant la transmission des signaux.

Pour que le ligand G-CSF interagisse avec son récepteur, le domaine CRH est indispensable avec notamment :

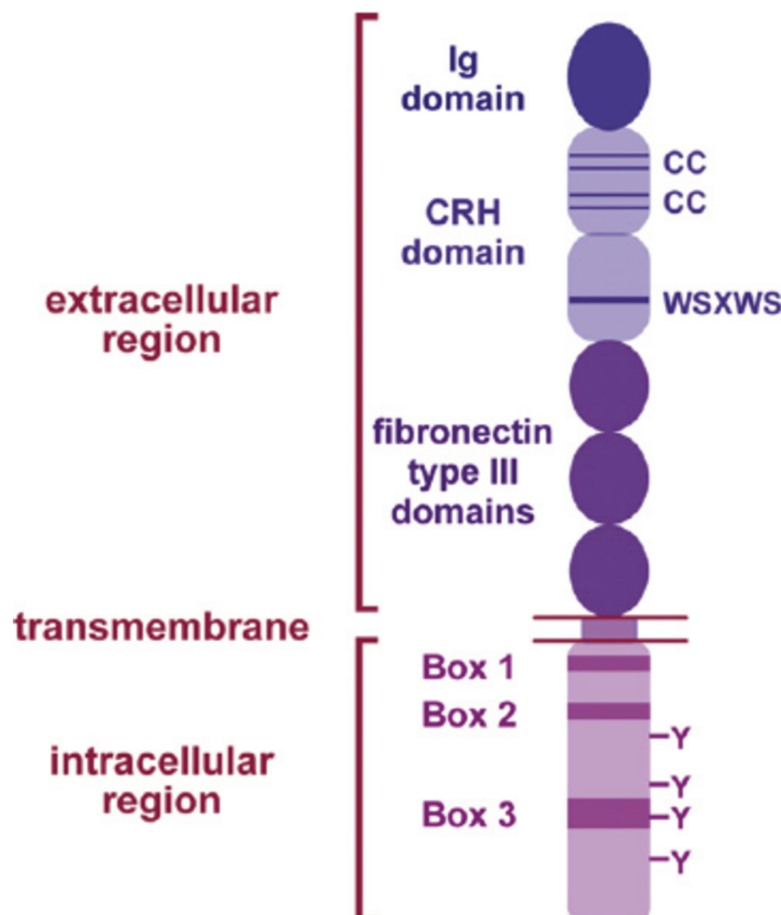
- Quatre résidus « cystéine » conservés dans sa partie N-terminale
- Un motif WSXWS dans sa partie C-terminale

ce dernier étant indispensable à l'oligomérisation du récepteur et à la formation d'une liaison de haute affinité avec le ligand.

A noter que le peptide signal de 23 acides aminés n'est pas comptabilisé lors des descriptions initiales des différentes mutations dans la littérature (T595I et T618I désignent par exemple la même mutation). Nous désignerons dans ce travail les mutations en incluant le peptide signal dans la suite du manuscrit.

Figure 1 : Structure de CSF3R.

Représentation schématique du récepteur au G-CSF mature, les domaines et résidus sont conservés parmi les membres de la superfamille des récepteurs de cytokines (Ig, immunoglobuline ; CRH, cytokine receptor homology ; C, cystéine ; W, tryptophane ; S, sérine ; X, acide aminé indéterminé). D'après Researchgate.



L'interaction du ligand avec le domaine CRH induit des modifications du domaine cytoplasmique du récepteur. Il s'agit de la phosphorylation de quatre résidus « tyrosine » qui deviennent des points d'ancrage pour des protéines à domaine SH2 de la signalisation intracellulaire. La fixation du G-CSF sur son récepteur active ainsi les voies JAK (Janus Activated Kinase) / STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription), les tyrosine kinases de la famille Src, et les voies PI-3K (Phosphatidylinositol-3-

kinase)/AKT (Protein kinase B) et MAPK (Mitogen-activated protein kinases).

La région juxta-membranaire du domaine cytoplasmique de CSF3R ne contient aucun de ces résidus tyrosine. Elle est pourtant indispensable à la transmission d'un signal de prolifération, en interaction avec la partie carboxy-terminale du récepteur.

b. Fonctions du récepteur

i. Physiologiques

La fixation du ligand G-CSF sur son récepteur CSF3R induit, par l'intermédiaire des voies de signalisation mentionnées ci-dessus, la différenciation, la prolifération et la survie cellulaires (15). La régulation négative de l'intensité de cette signalisation implique l'internalisation rapide du récepteur stimulé. Il sera ensuite dégradé dans le compartiment endosomal avant d'être ré-exprimé à la membrane. Cette notion aura son importance dans le cas des mutations du récepteur empêchant son endocytose par perte des motifs nécessaires à son internalisation.

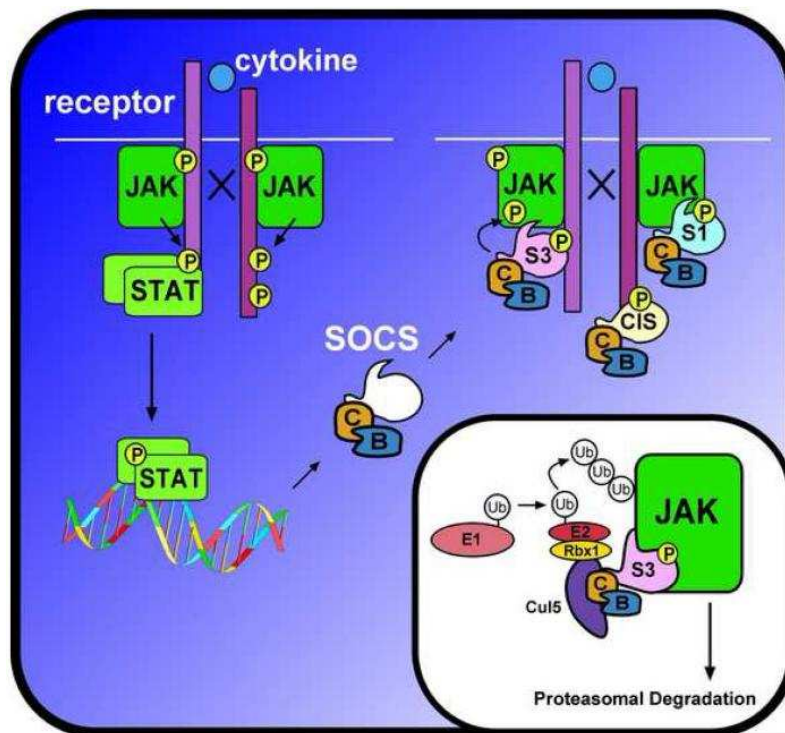
La fixation du ligand sur son récepteur entraîne une activation des voies de signalisation aboutissant à la survie et à la prolifération cellulaire, telles que JAK STAT (16,17), et la voie SRC (18,19) que nous reverrons en détail ultérieurement et qui constituent des cibles thérapeutiques potentielles.

Il existe des acteurs de régulation négative de ces voies de signalisation, comme les protéines SOCS. Une régulation étroite de ces cascades de signalisation est requise car une perte de contrôle promeut l'oncogenèse et l'inflammation chronique. Ces inhibiteurs agissent de deux façons : premièrement, le domaine SH2 des protéines SOCS se lie aux tyrosines phosphorylées du récepteur activé, ce qui interrompt le signal en

empêchant les autres protéines de se lier ; deuxièmement, les protéines SOCS contiennent un domaine, la boîte SOCS (box), qui recrutent une ubiquitine ligase E3, ce qui entraîne la dégradation de JAK par le protéasome (20). (Figure 2)

Figure 2 : Mécanisme d'action des protéines SOCS

La liaison de la cytokine sur son récepteur résulte en l'activation de la voie JAK/STAT puis l'induction de la transcription du gène *Socs* de façon dépendante de STAT. Les protéines SOCS inhibent ensuite le signal soit par inhibition directe de l'activité kinase de JAK (SOCS1 : S1), le recrutement de SH2 au niveau du domaine cytoplasmique du récepteur et l'inhibition par SOCS3 : S3; soit par compétition avec les domaines STAT-SH2 par SOCS2. Un niveau de régulation additionnel est assuré par le complexe E3 ubiquitine ligase lié au motif box de SOCS qui aboutira à la dégradation des protéines (JAK) par le protéasome. D'après Croker et al, SOCS Regulation of the JAK/STAT Signalling Pathway, *Semin Cell Dev Biol* 2008



ii. Pathologiques

Comme cela a déjà été évoqué précédemment, une anomalie de ces voies de signalisation ou de leur régulation peut aboutir à des pathologies notamment cancéreuses. Des mutations germinales ou somatiques de CSF3R sont responsables de pathologies diverses. Ces mutations sont le plus souvent activatrices de voies de signalisation ; mais elles peuvent aussi, rarement, être inhibitrices.

Un polymorphisme de CSF3R présent dans 6% de la population, G808K, dans la région intra-cellulaire du récepteur semble prédisposer aux SMD de haut risque. De façon intéressante, les blastes d'un patient ayant développé une LAM secondaire à un SMD de haut risque étaient homozygotes pour cet allèle (21), ce qui va dans le sens d'un rôle pathogénique de ce polymorphisme.

c. Les mutations de CSF3R identifiées

i. 2 grands types

1. Les mutations de l'exon 17 du domaine intra-cellulaire causent l'apparition d'un codon stop prématuré (mutation non sens) et aboutissent à un récepteur tronqué avec une perte de l'extrémité C-terminale qui affecte la transduction du signal. L'absence du motif de leucine empêche l'internalisation du récepteur qui reste donc exprimé à la surface cellulaire. La perte des sites de liaison à SOCS3 réduit le transfert de CSF3R vers le lysosome et la régulation négative de STAT5, expliquant l'hypersensibilité au G-CSF. La voie de signalisation SRC kinase est alors activée (22,23).
2. Les mutations de l'exon 14 sont juxta-membranaires (la plus fréquente est la T618I) et ont des conséquences différentes, à savoir une perte de O-glycosylation (24), une dimérisation et une

activation constitutive du récepteur en l'absence du ligand via une stabilisation des interactions transmembranaires « hélice-hélice » et une activation permanente (et augmentée) de la voie JAK STAT. Elles sont similaires aux mutations activatrices mises en évidence sur le récepteur de la thrombopoïétine, c-MPL, dans la thrombocytose héréditaire ou acquise (25). Une mutation récemment découverte dans les SMP atypiques, N610H, donc très proches de la T618I semble avoir des conséquences similaires (26).

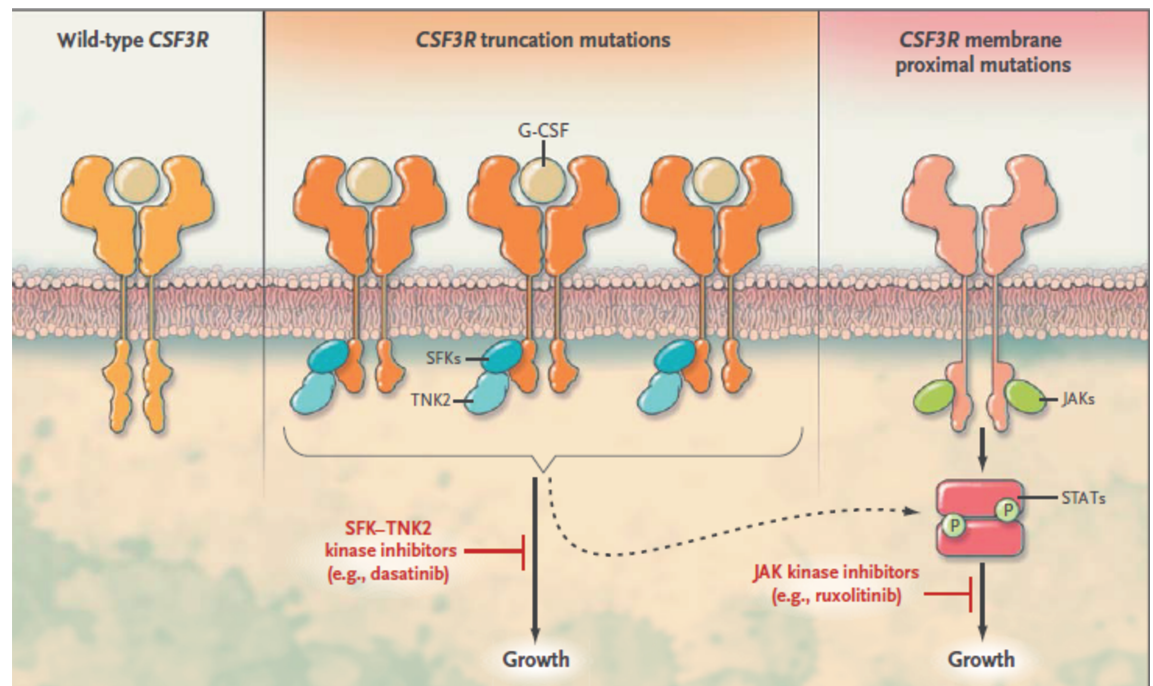
Ces mutations ont été appelées par certains auteurs « Hyperresponsive intracellular truncations » et « Activating transmembrane mutants » (27). On les appellera dans la suite du travail mutations de type 1 et de type 2, respectivement.

Ces 2 types de mutations peuvent être intriquées mais sont globalement retrouvées dans des pathologies différentes, activent des voies de signalisation distinctes et montrent une sensibilité respective au Dasatinib, inhibiteur des kinases SFK-TNK2, et au Ruxolitinib, inhibiteur de kinases JAK1/2 (28) (Figure 3). En réalité, l'activation de ces voies de signalisation n'est pas un phénomène si simple avec une séparation nette puisque les cellules exprimant un récepteur avec une mutation juxta-membranaire sont bien insensibles au Dasatinib mais en revanche celles qui expriment le récepteur tronqué sont également sensibles à l'inhibition par le Ruxolitinib, car une haute concentration du ligand (G-CSF) active également la voie JAK STAT. L'activation de STAT5 dans la signalisation en aval du récepteur tronqué explique la sensibilité aux inhibiteurs de JAK2 (29). Cette activation soutenue de STAT5 joue un rôle central dans la réponse hyperproliférative du récepteur tronqué (30). La signalisation d'autres voies, dont PI3K AKT et MEK, semble également contribuer à l'augmentation de la réponse mitogène. En revanche, STAT3 semble

exercer un effet négatif sur la prolifération en aval du récepteur entier « full-length » (31,32).

Figure 3 : Les 2 types de mutations de CSF3R et leurs voies de signalisation

D'après *Activating G-CSF Receptor Mutations In Neutrophilic Leukemias*, Gotlib, September-October 2013, Volume 10, Issue 5



Des mutations affectant le domaine extra-cellulaire ont également été décrites chez les patients atteints de NCS ou de neutropénie chronique idiopathique. Ces mutations ont en commun la particularité non seulement d'entraîner un récepteur déficient mais aussi de rendre, de manière dominante négative, les récepteurs sauvages co-exprimés anormaux également par hétérodimérisation entre un récepteur muté et un récepteur sauvage (33,34). Le récepteur muté diminue l'expression de surface du récepteur sauvage et inhibe donc la prolifération induite par CSF3R sauvage. Ces mutations sont localisées au niveau du domaine CRH, du motif WSXWS ou du domaine fibronectine. Bien que non directement leucémogènes, la neutropénie induite par ces mutations favorise un

contexte à risque. En effet, un patient atteint de NCS avec ce type de mutation a ensuite acquis une mutation non sens de type 1 (35). Contrairement aux 2 mutations principalement décrites, ces mutations du domaine extra-cellulaire sont inhibitrices.

d. Voies de signalisation

Les 2 voies principales mises en jeu dans les mutations de CSF3R sont les voies JAK STAT et Src kinases.

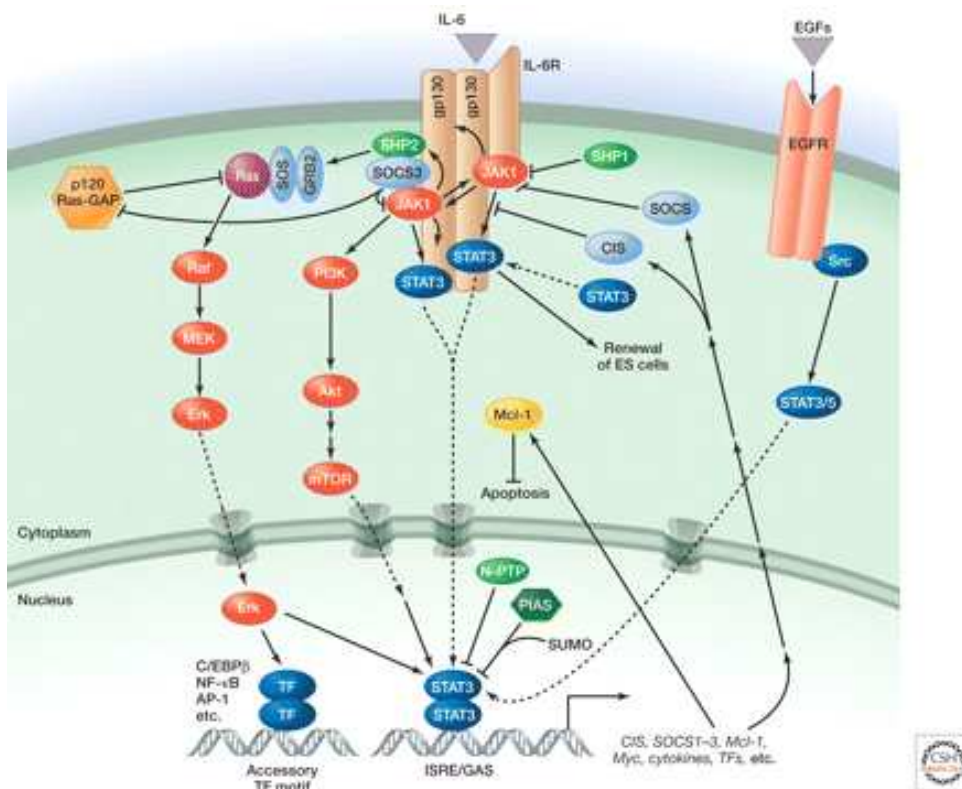
i. JAK STAT

De façon physiologique, lorsque le ligand se lie à son récepteur à la membrane, les protéines STAT inactives dans le cytoplasme sont phosphorylées par les tyrosines kinases JAK. Cette phosphorylation induit leur dimérisation sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères. Les domaines SH2 des protéines STAT permettent leur recrutement au niveau des résidus tyrosines phosphorylés, de plus l'interaction en *trans* entre le domaine SH2 d'un premier monomère STAT et la tyrosine phosphorylée d'un autre monomère STAT entraîne la formation des dimères STAT/STAT, qui migrent dans le noyau où ils se fixent sur des régions *cis* régulatrices de promoteurs de gènes et jouent le rôle de facteur de transcription (Figure 4).

Les voies de transmission du signal JAK STAT sont activées par plus de 20 cytokines différentes. Il existe des réponses spécifiques mais de façon générale cette cascade de signalisation aboutit à la prolifération et à la survie cellulaire.

Figure 4 : Voie JAK STAT

D'après Cold Spring Harb Perspect Biol 2012;4:a011205



ii. SRC kinase

Les kinases de la famille Src (SFK) sont impliquées dans de multiples processus tels que l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, la survie. Les membres de cette famille comprennent notamment les kinases Lyn, Blk, Lck, Fyn etc.

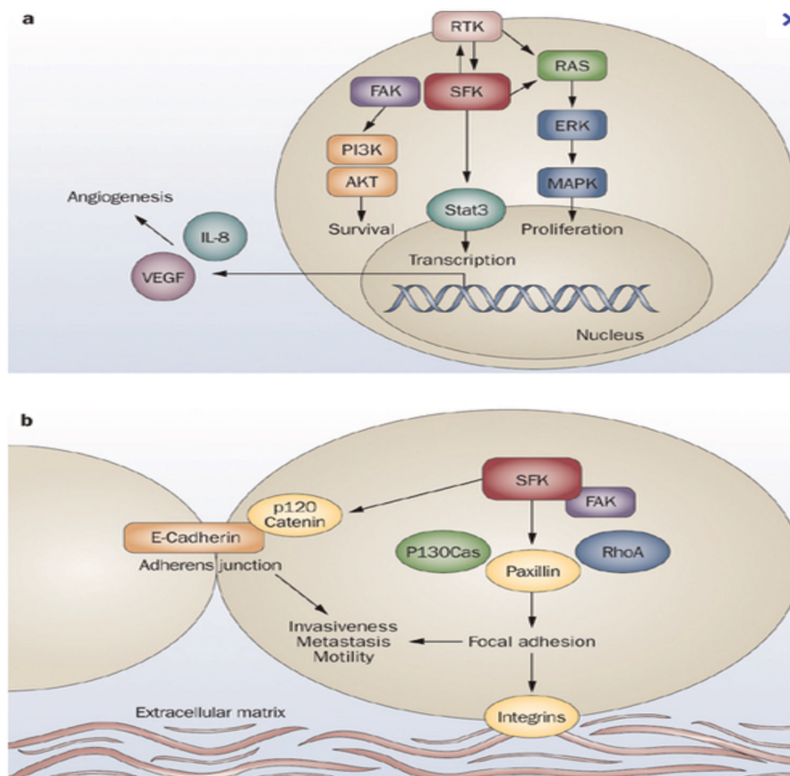
Les SFKs peuvent être activées par les récepteurs de tyrosine kinase, les récepteurs de cytokines, les récepteurs couplés aux protéines G etc, et coopérer dans l'activation de voies de signalisation d'aval comme la voie Ras/Erk/MAPK. L'activation des SFKs régule aussi la voie PI3K/AKT pour promouvoir la survie cellulaire. Les SFKs agissent aussi via des facteurs transcriptionnels comme STAT3 et entraînent la transcription et la sécrétion de facteurs de croissance pro-angiogéniques et de cytokines comme le VEGF et l'IL8.

Les SFK jouent un rôle dans le contrôle de l'adhésion cellulaire, les SFKs activées phosphorylent la caténine p120 et rompent les jonctions adhérentes stabilisées par la E-cadhérine. FAK est une cible d'aval des SFKs qui joue un rôle central dans l'invasivité des cellules tumorales. (Figure 5)

Figure 5 : Voie SFK

FAK, focal adhesion kinase ; IL-8, interleukin 8 ; PI3K, phosphoinositide 3-kinase ; RTK, receptor tyrosine kinase ; SFK, Src family kinase

D'après Nature Reviews Clinical Oncology 6, 587-595 (October 2009)



Spécifiquement dans la voie impliquée dans la signalisation de CSF3R muté dans la LCN, les SFKs interagissent avec ACK1 (TNK2 ou Cdc42-associated kinase) dont le rôle oncogénique est bien connu, notamment via l'activation de la voie PI3K AKT (36). Le Dasatinib empêche la phosphorylation de ACK1.

e. Oncogénicité de ces mutations

L'activation des mutants de CSF3R tronqués cause une réponse hyperproliférative au G-CSF dans la NCS et résulte en une activation prolongée de STAT5, étape essentielle dans l'expansion clonale des cellules souches hématopoïétiques et des progéniteurs granuleux. Cependant, même si la présence de mutations de CSF3R est un élément fréquent lors de la transformation d'une NCS en LAM (80%), il existe des enfants qui transforment alors qu'ils ne présentent pas de CSF3R muté, cette mutation n'est donc pas requise pour la transformation (37).

La question de savoir si les mutations de CSF3R sont causales pour la transformation ou si le G-CSF contribue au processus de leucémogénèse en permettant de sélectionner l'expansion des progéniteurs déjà déficients reste controversée. Le risque relatif de développer une LAM était significativement plus important chez les patients recevant du G-CSF et cela de manière dépendante de la dose reçue (38) mais si les patients nécessitent des doses accrues de G-CSF, cela pourrait être en raison de progéniteurs déjà « plus endommagés » aboutissant à une moindre réponse à la stimulation et ils seraient possiblement intrinsèquement plus enclins à se transformer.

Dans la NCS, une étude portant sur 374 patients a montré que le risque de développer sous G-CSF une LAM augmente avec le temps, 2,9% à 6 ans, 8% à 12 ans et à 10 ans l'incidence cumulée est de 21% (39).

Le risque leucémogène du G-CSF est une question qui se pose également en dehors du contexte de NCS notamment concernant l'inocuité de ce

traitement pour les donneurs de cellules souches périphériques. Ce traitement est administré pendant plusieurs jours afin de mobiliser les cellules souches de la moelle vers le sang avant leur recueil par cytophérèse. Deux études indépendantes incluant plus de 5000 patients avec un suivi médian de 5 ans ne retrouvaient pas d'augmentation de l'incidence de LAM en comparaison aux personnes non exposées au G-CSF (40,41). Une LAM avait été rapportée chez 2 donneurs apparentés de cellules souches périphériques sur 200, cependant on sait que les apparentés au premier degré de patients ayant une LAM ont 2 à 5 fois plus de risque de développer une LAM.

Un autre cas de figure est celui du traitement par G-CSF dans le cadre d'autres pathologies prédisposant déjà aux LAM, comme les SMD ou les aplasies médullaires idiopathiques. Une combinaison de G-CSF et d'EPO peut être proposée dans ce contexte. Une étude rétrospective portant sur 840 patients atteints d'aplasie médullaire ayant reçu un traitement immunosuppresseur avec ou sans G-CSF montrait une petite augmentation du risque de SMD/LAM dans le groupe traité par G-CSF avec un HR de 1,9 (42). Cependant, une méta-analyse de 6 études randomisées incluant 141 patients ne montrait pas d'augmentation de risque significative de développer un SMD ou une LAM (43), résultat retrouvé dans d'autres études (44). Une étude japonaise retrouve une incidence de LAM plus importante sous G-CSF, mais il semble y avoir un facteur confondant puisque les anomalies du chromosome 7, connues pour être de mauvais pronostic, sont plus fréquentes dans le groupe de patients japonais (45) avec une stimulation préférentielle des clones avec monosomie 7 par le G-CSF et un lien avec une augmentation d'expression de l'isoforme IV, issue de l'épissage alternatif (12). L'augmentation du risque de LAM dû au traitement par G-CSF chez les patients ayant un SMD ou une aplasie médullaire semble faible mais une relation causale ne peut être complètement exclue.

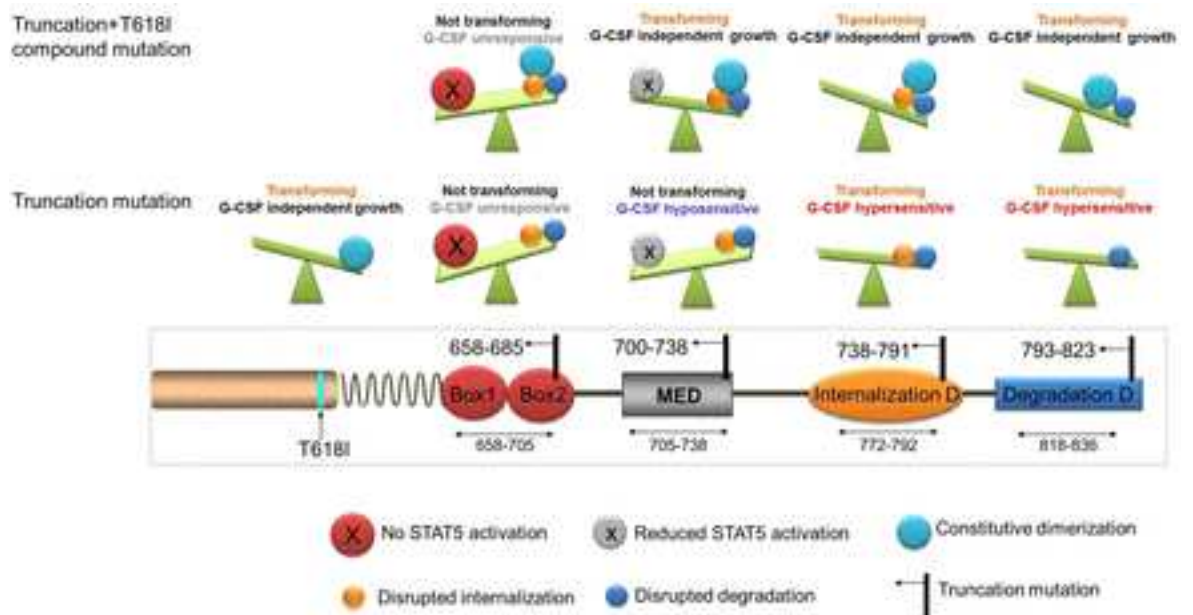
Un des mécanismes pouvant également contribuer au pouvoir oncogènes des mutations aboutissant à un récepteur tronqué est la production de radicaux libres (ROS) entraînant des dommages à l'ADN en augmentant le taux de mutations dans les précurseurs hématopoïétiques et/ou en inactivant des phosphatases, telles que PTEN, qui régulent négativement la signalisation cellulaire (22,46). Une stimulation par le G-CSF a montré une augmentation des ROS dépendant du temps et de la dose, corrélée à l'activation de LYN et AKT dans les cellules exprimant le récepteur tronqué en comparaison à celles exprimant le récepteur sauvage. L'un des bénéfices apporté par les thérapeutiques ciblant la cascade de signalisation Lyn-PI3K-AKT passe par la diminution de la production de radicaux libres. *In vitro*, un traitement antioxydant par N-acétylcystéine semble efficace pour réduire la phosphorylation d'AKT, la génération de ROS et la prolifération cellulaire.

La compréhension du pouvoir oncogénique des mutations cytoplasmiques de CSF3R reste incomplète et les hypothèses physiopathologiques discutées. Une étude récente a repris les données de NGS dans les LCN, les LMCa, les SMP inclassables (8,5% de mutations de CSF3R, N=212) et dans les LAM (1,3% de mutations, N=378). 72,2% des mutations cytoplasmiques de CSF3R coïncident avec des mutations juxta-membranaires (T618I). Pour évaluer le potentiel leucémogène de ces mutations cytoplasmiques, les auteurs ont recherché la portion minimale nécessaire devant être absente pour être leucémogène en les transduisant dans les lignées murines Ba/F3. Les mutations non sens situées entre les acides aminés 738 et 791 et entre 793 et 823 transforment les Ba/F3 et induisent une hypersensibilité au G-CSF par absence d'internalisation du récepteur. De façon intéressante, les mutations comprises entre les acides aminés 700 et 738 ne transforment pas les lignées Ba/F3 quand elles sont isolées, mais elles les transforment si elles sont combinées à la mutation T618I et sont moins sensibles au G-CSF à cause de l'interruption de domaines mitogéniques. Les mutations comprises entre les acides

aminées 658 et 685 empêchent l'activation de STAT 5, ne transforment pas les Ba/F3 et ne répondent pas au G-CSF, même si combinées aux récepteurs mutés T618I. Les auteurs ont donc défini la région cytoplasmique du récepteur dans laquelle la survenue de mutation entraîne une capacité leucémogène (47). (Figure 6)

Figure 6 : Illustration schématique de la localisation des mutations non sens de CSF3R et leurs conséquences fonctionnelles. D'après Zhang 2016

MED, mitogenic domain : D, domain



Il est probable qu'une seule mutation (CSF3R ou autre) ne soit pas suffisante pour aboutir à une leucémie et que des phénomènes de coopération oncogéniques soient mis en jeu pour aboutir à la transformation oncogénique (concept du « double hit »), avec SETBP1 dans la LCN (48), ETKN1 dans la LMCa (49) ou RUNX1 dans les LAM (50), nous en reparlerons dans les chapitres dédiés à ces pathologies. Les mécanismes exacts de coopération oncogénique ne sont pas bien élucidés.

III) Neutropénie congénitale sévère (NCS)

a. Définition/présentation de la maladie

Il existe deux types principaux de NCS, 60% sont représentés par les NCS avec mutations d'ELA2 (=ELANE) de transmission autosomique dominante, et 30% par des mutations du gène HAX1 (Syndrome de Kostmann) de transmission autosomique récessive. Le type de mutation et le mode de transmission n'influent pas sur le phénotype clinique. Parfois, aucune mutation n'est identifiée, il existe aussi des mutations rares (GFI1, WAS, MABPIP...). La NCS est considérée comme un syndrome pré-leucémique, en effet, plus de 25% des enfants atteints développeront une LAM dans les 20 ans qui suivent le diagnostic (51).

Le diagnostic est posé dans l'enfance, souvent dans les premiers mois de vie. La maladie est fréquemment révélée par des infections bactériennes sévères récurrentes. Sur le plan clinique, les enfants présentent typiquement une hypertrophie gingivale.

La formule leucocytaire retrouve des polynucléaires neutrophiles (PNN) < 0,2 G/L (ou 0,5 G/L selon les sources) en l'absence d'anticorps anti-neutrophiles (52). S'y associent souvent une monocytose et une hyperéosinophilie.

Le myélogramme met en évidence un arrêt de maturation des précurseurs granulocytaires au stade de promyélocytes ou de myélocytes. Le noyau des promyélocytes présente une morphologie atypique et un cytoplasme vacuolisé, le nombre de promyélocytes est par ailleurs souvent augmenté.

b. Physiopathologie

Les mutations hétérozygotes d'ELA2 sont retrouvées dans 50 à 60% des cas et constituent le mécanisme dominant. Ces mutations entraînent la

production d'une élastase neutrophile (NE) non fonctionnelle. Deux cas de mosaïcisme paternel pour ELA2 ont été décrits, mais la protéine NE mutante n'a pas d'effet sur les PNN sauvages. Les mutations d'ELA2 sont également responsables de neutropénie cyclique, de transmission autosomique dominante, mais responsables d'infections moins sévères.

La NE est physiologiquement synthétisée dans le PNN en cours de maturation en tant que pro-enzyme mais stockée dans les granules primaires dans sa forme active, relarguée des granules au niveau des sites d'inflammation. Le rôle pathologique de la protéine mutante dans la neutropénie peut être directement liée à la mauvaise survie des précurseurs myéloïdes dans la NCS, l'apoptose accrue des promyélocytes et des myélocytes explique le blocage de maturation à ce stade, mais les interactions spécifiques inter-protéiques responsables de la NCS chez les patients avec une NE mutée ne sont pas complètement comprises. Les analyses de structure protéique suggèrent que des anomalies de conformation de la protéine mutée sont responsables de sa perte de fonction (53).

La diversité des mutations d'ELA2 et l'absence d'effet évident de la protéine NE mutée sur ses propriétés enzymatiques suggèrent encore que la neutropénie est plutôt liée à la structure de l'enzyme (54). Les mutations d'ELA2 entraînent des protéines NE mal conformées dans le RE, reconnues par le système UPR et aboutissent à des processus apoptotiques dépendants des UPR (55). L'UPR est une réponse au stress cellulaire liée au reticulum endoplasmique (RE). Elle est activée en réponse à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Le but de cette réponse est de dégrader les protéines mal conformées et d'activer les voies de signalisation afin d'augmenter la synthèse de protéines chaperonnes, le cas échéant, la cellule entrera en apoptose. Une réponse UPR anormalement soutenue est observée dans les maladies neurodégénératives. Dans la NCS, la propension des protéines

NE à être mal conformées déterminerait le taux d'apoptose induite par l'UPR et ainsi la sévérité du phénotype (neutropénie). La protéine chaperonne BIP (de la famille des HSP 70) est surexprimée dans la SCN, renforçant l'argument de l'anomalie conformationnelle comme mécanisme physiopathologique.

Un travail récent suggère que le récepteur tronqué de CSF3R (d715) inhiberait l'expression de la NE induite par le G-CSF par un mécanisme dominant négatif. CSF3R d715 supprimerait la réponse UPR et l'apoptose induite par la NE mutante et entraînerait une activation soutenue d'AKT et de STAT5 et une augmentation de l'expression de BCL-XL. Le récepteur tronqué protégerait donc les précurseurs myéloïdes de l'apoptose induite par la NE mutante (56). L'évasion à l'apoptose est un des hallmarks du cancer (57).

En revanche, la NE ne semble pas requise pour la granulopoïèse puisque la délétion d'ELA2 dans un modèle murin n'a pas d'effet sur l'hématopoïèse.

La protéine HAX1 régule la membrane mitochondriale et la viabilité cellulaire, le lien entre le déficit en HAX1 et la neutropénie n'est pas clairement défini.

Il existe probablement des voies d'aval communes après mutation d'ELA2 ou HAX1, avec la perte du facteur de transcription LEF1 et une diminution de l'expression de CEBP α et de survivine qui diminuent la survie et la différenciation des progéniteurs granulocytaires aboutissant à l'arrêt de maturation de la lignée granuleuse, responsable de la neutropénie (58).

c. Traitement

Depuis 1987, un traitement par G-CSF est administré dans cette pathologie (59,60), il a permis d'améliorer la qualité de vie et le pronostic, notamment en diminuant l'incidence des infections bactériennes. Avant ce

traitement, 50% des enfants mouraient d'infections pendant la première année de vie. On observe plus de 90% de réponse au G-CSF (registre SCNIR) avec une nette diminution de la prescription d'antibiotiques et de l'incidence des hospitalisations (61). L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques reste le seul traitement pour les patients réfractaires au G-CSF et/ou ayant développé un SMD ou une LAM.

Il semblerait que les doses de G-CSF nécessaires pour obtenir un taux de PNN > 1 G/L soient plus faibles en cas de mutation de HAX1 qu'en cas de mutations d'ELA2. Comme évoqué précédemment, le risque leucémogène de ce traitement est controversé. Pendant longtemps, aucune transformation en LAM n'avait été observée chez les patients atteints de neutropénie cyclique (avec mutation d'ELA2) traités par G-CSF mais 2 cas ont été récemment décrits (62) et des patients avec une SCN ont transformé sans avoir reçu de traitement par G-CSF. Il n'y a pas de différence de risque de développer une LAM en fonction du type de mutations HAX1 ou ELA2 malgré une dose de G-CSF différente, alors que certaines études font le lien entre la dose de G-CSF reçue et la transformation en LAM, donc la responsabilité du G-CSF sur la survenue de LAM, si elle existe, est complexe.

d. Mutations de CSF3R acquises et transformation en LAM

Les mutations de la partie intra-cytoplasmique (type 1) étaient initialement considérées comme causales dans la NCS (63) mais il est apparu évident que ces mutations somatiques étaient acquises au cours de l'évolution de la NCS. 30% des patients atteints de NCS acquièrent une mutation de CSF3R au cours de l'évolution de la maladie, et le taux est de 80% chez ceux qui transforment en LAM (ou plus rarement LAL, LMMC), suggérant que ces mutations interviennent activement dans la leucémogénèse.

Ces mutations induisent un codon stop aboutissant à un récepteur au G-CSF tronqué avec perte du domaine C-terminal et perte de tyrosine(s),

c'est-à-dire le premier type de mutations décrit plus haut (exon 17). Dans la majorité des cas, seul un allèle est affecté.

In vitro, l'expression de ces mutations entraîne dans des lignées cellulaires myéloïdes une augmentation de la prolifération, une résistance à l'apoptose et une survie accrue. Les souris *knock-in* avec le récepteur muté développent une réponse hyperproliférative au G-CSF exogène, en revanche malgré l'administration prolongée de G-CSF, aucune n'a développé de leucémie (64).

Une analyse des mutations de CSF3R chez 148 patients atteints de NCS (37) a mis en évidence 41% des patients ayant acquis une mutation non sens du récepteur. 5 patients sur 30 (17%) avaient acquis la mutation avant tout traitement, démontrant encore que le G-CSF n'est pas à lui seul responsable de l'acquisition de ces mutations. On constate 34% de mutations de CSF3R chez les patients qui n'ont pas développé d'hémopathie secondaire versus 78% chez ceux qui ont développé une LAM (ou rarement une LAL). Les mutations de CSF3R ont été détectées dans 17 nucléotides différents et on observe une augmentation du nombre de mutations au cours du temps, en faveur d'une instabilité génétique de CSF3R. L'acquisition de ces mutations semble être un événement précoce dans la leucémogénèse, d'autres événements moléculaires doivent s'y associer pour aboutir à une LAM. Le délai entre la détection de mutations de CSF3R et le diagnostic de LAM est extrêmement variable (65).

Ce récepteur tronqué affecte l'endocytose et la signalisation du récepteur, avec une activation de STAT5 par perte d'endocytose entraînant une prolongation du signal. La protéine SOCS3 supprime l'activation de STAT3 et de STAT5 (34) dans les cellules avec le récepteur sauvage, en revanche dans les cellules exprimant le récepteur muté, STAT3 est bien réprimé mais la suppression de STAT5 est complètement perdue. En effet, l'inhibition de STAT5 par SOCS3 nécessite des mécanismes contrôlés par

l'extrémité C-terminale du récepteur qui manque dans la protéine mutante (66). Sachant que STAT5 contribue à la réponse proliférative au G-CSF et que STAT3 est inhibiteur, l'augmentation du ratio STAT5/STAT3 entraîne une anomalie du signal du récepteur tronqué au bénéfice de la prolifération expliquant l'hypersensibilité au G-CSF, potentiellement leucémogène (67). La mutation de CSF3R confère un avantage clonal aux cellules souches hématopoïétiques via l'activation de STAT5 dépendant du G-CSF exogène (30,68), et l'activation prolongée de STAT5 dans les cellules portant le récepteur muté augmente le risque d'aberrations moléculaires additionnelles.

En parallèle, l'activation constitutive de STAT5 altère la myélopoïèse en diminuant l'expression de facteurs de différenciation myéloïde tels que CEBPA (69) et LEF1 (58).

Un autre argument pour un rôle causal des mutations de CSF3R dans la LAM est apporté par une étude chez la souris montrant une coopération entre le récepteur CSF3R tronqué (celui retrouvé dans la NCS) et PML-RARA pour induire une LAM (70). Chez la souris, l'expression du récepteur au G-CSF tronqué confère un fort avantage prolifératif aux CSH, avantage dépendant du G-CSF (30). Cela est concordant avec le fait que dans la NCS, la plupart des patients (mais pas tous) ont un taux de cellules circulantes exprimant le CSF3R muté qui augmente dans le temps (37,71). De plus, une étude a montré que les mutations de CSF3R sont présentes dans toutes les lignées hématopoïétiques (dont les lymphocytes), suggérant que l'expansion clonale chez les patients NCS se produit au stade de CSH (72). Les souris exprimant le CSF3R muté seul ne développent pas de LAM, même sous G-CSF au long cours. Des études avaient déjà montré qu'une duplication en tandem de FLT3 (FLT3-ITD) pouvait coopérer avec PML-RARA pour induire une LAM3 (73) et l'hypothèse des auteurs était que CSF3R muté pouvait jouer le même rôle activateur dans la leucémogénèse. Aucune translocation (15,17) n'a été

mise en évidence dans les LAM secondaires aux NCS, mais cette étude sur un modèle murin peut être considéré comme une preuve que les mutations non sens de CSF3R sont leucémogènes. Cette coopération oncogénique était dépendante du G-CSF. Cette observation est pertinente dans le contexte puisque les patients NCS présentent des taux de G-CSF élevés soit en raison de l'administration exogène soit par production endogène, en réponse à la neutropénie. La dépendance au G-CSF des mutations de type 1 de CSF3R peut expliquer pourquoi les mutations de CSF3R sont fréquentes dans les SMD/LAM survenant dans le contexte de NCS alors qu'elles sont exceptionnelles dans les LAM *de novo*.

Des facteurs de risque de développer une LA secondaire ont été identifiés : présence d'une monosomie du chromosome 7, association à des mutations de RAS, trisomie 21, mutations de CSF3R et absence de réponse au G-CSF. Ce dernier facteur est difficile à interpréter, le risque de développer une LA augmenterait avec la dose de G-CSF administrée mais la cause de cette résistance au G-CSF, comme déjà évoqué précédemment, est peut être une cellule plus atteinte, donc la résistance au traitement ne serait qu'une conséquence d'une cellule déjà plus à risque de se transformer ? Un autre aspect purement logique mais qui induit un biais certain dans le fait de considérer le G-CSF comme facteur de risque de transformation est qu'avant l'ère du traitement par G-CSF, les patients mouraient d'infections avant d'« avoir eu le temps » de développer une LAM.

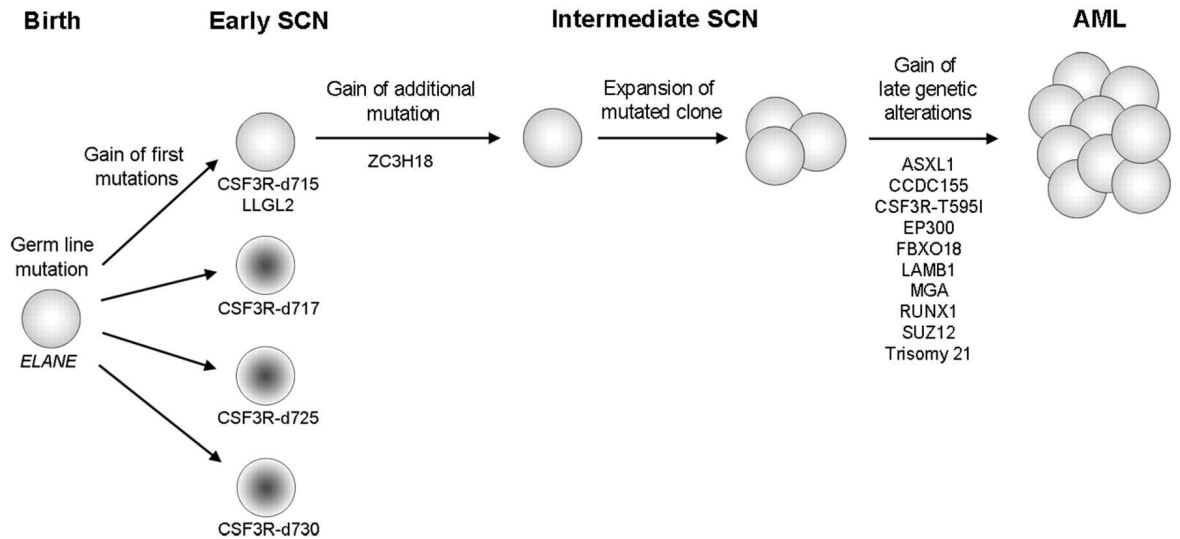
La transformation se fait surtout en LAM, mais 2 cas de LAL ont été décrits (74,76) et un cas de LMMC chez un patient n'ayant jamais reçu de G-CSF, avec une association à une mutation de NRAS et une monosomie du chromosome 7 (77). Une LA biphénotypique est également survenue après une NCS (50).

La relation causale entre les mutations non sens de CSF3R et la LAM est donc complexe puisque : l'acquisition de mutation de CSF3R n'aboutit pas toujours à une transformation, il a été observé des mutations transitoires de ce récepteur (65) et des cas de LAM sans mutation de CSF3R sont rapportés. Certains auteurs concluent que le rôle de CSF3R dans la leucémogénèse est très probable mais possiblement pas central (37).

Une autre étude plus récente de Whole Exome Sequencing (78) a retrouvé, chez un patient ayant développé une LAM 17 ans après le début du traitement par G-CSF pour une NCS, 12 mutations non synonymes. 3 mutations étaient présentes en phase précoce de SCN, soit 15 ans avant le diagnostic de LAM : une mutation de CSF3R d715 (Q716X), une mutation de LLGL2 puis secondairement une mutation de ZC3H18. Le clone portant ces 3 mutations s'expand 6 ans plus tard (soit 9 ans avant le diagnostic de LAM), tandis que d'autres clones avec d'autres mutations de CSF3R (d717, d725, d730) s'éteignent. Une nouvelle mutation T618I (appelée T595I dans la figure pour les raisons citées précédemment) apparaît dans le domaine juxta-membranaire de CSF3R sur l'allèle déjà muté d715, donc sur un récepteur probablement déjà défectueux, au moment du diagnostic de LAM (Figure 7). Des études murines retrouvent des résultats concordants, à savoir l'introduction du récepteur mutant T618I dans des progéniteurs murins déjà déficients entraîne une prolifération indépendante du G-CSF des cellules myéloïdes formant des colonies.

Figure 7 : Représentation schématique de l'évolution clonale de la NCS à la LAM

La mutation germinale ELANE est indiquée. Un gain séquentiel de mutations de CSF3R d715 et LLGL2 est observé dans la phase précoce de la NCS. Seul le clone avec ces 2 mutations acquiert la mutation additionnelle de ZC3H18 entraînant son expansion clonale. Le gain de 9 mutations additionnelles (dont la mutation T595I/618I) et de trisomie 21 précède le diagnostic de LAM (78). Beekman, Blood 2012



Le mécanisme semble donc être un processus multi-étapes avec des clones acquérant des mutations précocement (d715) suivi d'une expansion clonale sélective puis acquisition de nouvelles mutations (*CSF3R T618I*, *RUNX*, *ASXL1*) aboutissant au développement de la LAM. Le gain de fonction est dû à la mutation *T618I* seule mais les doubles mutants *T618I/d715* forment de plus grosses colonies *in vitro*, suggérant une capacité de prolifération plus importante. C'est le premier exemple de gain de 2 mutations différentes sur le même récepteur découvert dans un processus de transformation. Concernant le rôle du G-CSF, on peut supposer que la pression de prolifération continue induite par le G-CSF sur les clones portant les mutations *CSF3R d715* et *LLGL2* puis *ZC3H18* ait sélectionné un clone ayant cette mutation auto-activatrice pour qu'il devienne le clone leucémique dominant.

Les mutations de *CSF3R* de type 1 sont les anomalies identifiées le plus fréquemment dans les NCS avec mutations de *ELANE* ou de *HAX1*. Puisque les clones exprimant ces mutations émergent avant le développement de la LAM, on peut supposer que la signalisation anormale en aval de *CSF3R* tronqué aggrave les dommages accumulés dans les

CSH et les progéniteurs hématopoïétiques dans la NCS à cause des mutations de ELANE ou HAX1.

Malgré ce modèle séduisant, les souris avec CFS3R d715 ne développent pas spontanément de leucémie. Cela peut être expliqué par le fait que les souris ne sont pas systématiquement exposées au G-CSF ou que leur durée de vie est trop courte pour mettre en évidence le potentiel leucémogène de la mutation. Une explication alternative serait d'imaginer que le pouvoir oncogène des mutations de CSF3R ne se révèle qu'en présence d'un défaut génétique qui sous-tend la NCS (mutations d'ELA2, de HAX1 ou de WAS). L'expérience est difficile à reproduire chez la souris car les souris mutées pour les gènes ELA2/HAX1 ne présentent pas de neutropénie, suggérant que les conséquences de ces mutations sur la granulopoïèse chez la souris sont moins sévères voire absentes.

Il est intéressant de noter que les mutations retrouvées dans les LAM *de novo* (NPM1, FLT3...) n'ont pas été mises en évidence dans les LAM secondaires aux NCS, allant dans le sens d'un mécanisme physiopathologique distinct.

IV) Leucémie chronique à neutrophiles

a. Définition/présentation de la maladie

C'est une pathologie très rare (seulement 150 cas décrits dans la littérature), survenant chez les patients âgés (âge médian au diagnostic de 66 ans) dont 56% d'hommes. La médiane de survie est inférieure à 2 ans (79).

Cliniquement, les patients sont fréquemment asymptomatiques et la neutrophilie est découverte de façon fortuite. L'asthénie est un symptôme assez fréquent bien que non spécifique, et rarement les patients présentent des signes généraux tels que des sueurs nocturnes, une perte

de poids, des hématomes. Une splénomégalie est palpable dans 36% des cas (79,80).

La majorité des patients n'a pas d'anomalie cytogénétique, 23% présentent une anomalie aspécifique (del20q, trisomie 21, del 11q, del12p).

Les critères diagnostiques OMS viennent d'être révisés en 2016 en incluant les mutations de CSF3R T618I (7) (Figure 8).

Les 5 critères diagnostiques comprennent une leucocytose > 25 G/L, une hypercellularité à la BOM, l'exclusion des critères OMS pour d'autres SMP, l'absence de réarrangement des gènes PDGFRA ou B et la présence de la mutation CSF3R T618I (ou autre mutation activatrice). Il est spécifié qu'en l'absence de mutation de CSF3R, sont requis que la neutrophilie soit chronique (>3 mois), qu'il y ait une splénomégalie sans autre cause pouvant expliquer la neutrophilie et si possible la démonstration d'une clonalité en cytogénétique ou biologie moléculaire.

Des cas de gammopathie monoclonale associés à la LCN (sans mutation de CSF3R) ont été décrits avec un bien meilleur pronostic. Il est licite de considérer que ces patients ne présentent pas un réel SMP (81), mais que la neutrophilie est un phénomène réactionnel par sécrétion de G-CSF par les plasmocytes tumoraux, avec une rémission spontanée de l'apparente « LCN » au cours du traitement de la gammopathie, d'où le 6^{ème} critère de l'OMS nécessitant l'exclusion d'autres causes de neutrophilie, incluant la dyscrasie plasmocytaire. La démonstration de la polyclonalité des PNN ou une concentration plasmatique élevée en G-CSF sont des arguments en faveur d'une neutrophilie réactionnelle à une gammopathie monoclonale.

Le pourcentage de mutations de CSF3R dans la LCN retrouvé dans la littérature varie de 59% à 83% (82).

On considère que 30% ont une mutation non sens du domaine cytoplasmique (de type 1) sur le même allèle.

Le pronostic est sombre. Une transformation blastique survient dans 20% des LCN, en moyenne 21 mois après le diagnostic.

Figure 8 : Critères diagnostiques OMS 2016 de la Leucémie Chronique à Neutrophiles

CNL diagnostic criteria
1. PB WBC $\geq 25 \times 10^9/L$
Segmented neutrophils plus band forms $\geq 80\%$ of WBCs
Neutrophil precursors (promyelocytes, myelocytes, and metamyelocytes) $< 10\%$ of WBC
Myeloblasts rarely observed
Monocyte count $< 1 \times 10^9/L$
No dysgranulopoiesis
2. Hypercellular BM
Neutrophil granulocytes increased in percentage and number
Neutrophil maturation appears normal
Myeloblasts $< 5\%$ of nucleated cells
3. Not meeting WHO criteria for <i>BCR-ABL1</i>⁺ CML, PV, ET, or PMF
4. No rearrangement of <i>PDGFRA</i>, <i>PDGFRB</i>, or <i>FGFR1</i>, or <i>PCM1-JAK2</i>
5. Presence of <i>CSF3R</i> T618I or other activating <i>CSF3R</i> mutation
or
In the absence of a <i>CSF3R</i> mutation, persistent neutrophilia (at least 3 mo), splenomegaly and no identifiable cause of reactive neutrophilia including absence of a plasma cell neoplasm or, if present, demonstration of clonality of myeloid cells by cytogenetic or molecular studies

b. Physiopathologie

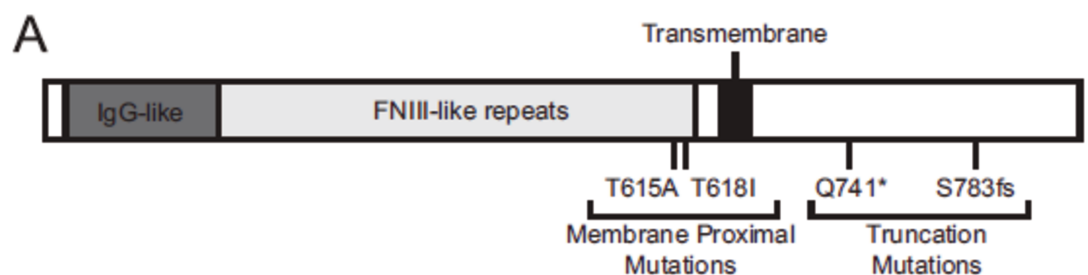
Les mutations de CSF3R en position juxta-membranaire, de type T618I (ou plus rarement T615I) retrouvées majoritairement dans la LCN, présentent un mécanisme d'activation différent des mécanismes décrits précédemment avec les mutations aboutissant à un récepteur tronqué. Les 2 types de mutations ne sont pas exclusives et peuvent même avoir un effet synergique dans la leucémogénèse (28). On retrouve dans ces cas les 2 caractéristiques des mutations avec une activation des 2 voies de

signalisation JAK STAT et Src kinase, les transductions dans lignées cellulaires ou chez la souris montrent des capacités de prolifération très augmentées par rapport à chaque mutation exprimée séparément. Les 2 mutations surviennent dans le même allèle, comme dans le cas du patient NCS ayant développé une LAM (Figure 7).

Pour plus de clarté, la localisation des 2 types de mutations est représentée dans la Figure 9.

Figure 9 : Schéma de la localisation des mutations de CSF3R juxta-membranaires et dans le domaine C-terminal non sens. Le domaine transmembranaire est représenté en noir.

D'après Maxson J Biol Chem, 2014 (24)



La transduction des lignées murines Ba/F3 par les 2 types de récepteur mutants confirme l'indépendance au ligand pour la prolifération des mutations juxta-membranaires uniquement (24) et contrairement aux mutations non sens, le récepteur muté T618I n'est pas surexprimé à la membrane.

Il a été montré que le récepteur T618I perd la O-glycosylation sur les résidus sérines et thréonines, permettant une dimérisation constitutive du récepteur par diminution de l'encombrement stérique. Cette dimérisation, en absence du ligand, active la voie JAK STAT de façon permanente

entraînant survie et prolifération, ayant pour conséquence directe la neutrophilie observée dans cette pathologie.

Une dimérisation constitutive du récepteur entraînant une activation de la voie JAK STAT a également été décrite chez une famille présentant une neutrophilie héréditaire (83). Cette mutation autosomique dominante T640N (anciennement T617N) a été détectée chez une famille suivie à l'Institut Gustave Roussy chez qui 12 personnes sur 16 sont atteintes, les mécanismes mis en jeu sont comparables à ceux décrits dans la LCN. 1 patient sur les 12 a développé un SMD. Les cellules souches hématopoïétiques induisent un processus « SMP-like » dans les modèles murins de xénotransplantation.

c. Traitement

Cette pathologie au pronostic sombre ne relève pas de thérapies efficaces. Il était parfois proposé une irradiation splénique ou une splénectomie mais cette dernière a tendance à aggraver la leucocytose et n'est plus recommandée (84). Les agents cytoréducteurs, l'hydroxyurée ou l'interféron α , permettent de contrôler la myéloprolifération pour une courte durée. Aucune réponse complète n'a pu être obtenue après chimiothérapie d'induction intensive (anthracyclines et aracytine) chez les patients en accélération blastique (85). L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques reste le seul traitement potentiellement curatif, mais étant donné la rareté de la pathologie, l'âge avancé des patients, seulement très peu de cas ont pu être rapportés. Les résultats sont décevants avec une forte proportion de décès précoces (79,86).

D'autres approches thérapeutiques sont donc indispensables.

Des cellules d'un patient atteint de LCN ont montré une sensibilité au Ruxolitinib *in vitro*, de façon dose dépendante, avec une diminution de la neutrophilie et des plaquettes (28).

Les études murines concernant l'efficacité du Ruxolitinib sont également encourageantes. La souris transplantée avec le récepteur T618I développe un SMP caractérisé par une neutrophilie, une hypercellularité médullaire et une infiltration hépatique et splénique par des PNN matures, rapidement fatal. Un traitement par Ruxolitinib chez la souris a permis une diminution de la neutrophilie associée à une diminution de la splénomégalie, confirmant que cette mutation T618I était suffisante pour induire un SMP de type LCN, sensible aux inhibiteurs de JAK.

Un essai de phase 2 est en cours de recrutement pour tester l'efficacité du Ruxolitinib chez les patients atteints de LCN ou de LMCa. Son objectif primaire est d'évaluer la proportion de réponse hématologique (complète ou partielle), les objectifs secondaires d'évaluer la diminution de la splénomégalie, la durée de réponse, l'incidence d'effets secondaires de grades III ou IV (NCT02092324).

Le cas d'une patiente de 74 ans avec une LCN traitée par Ruxolitinib a été rapportée récemment (87), cette patiente présentait les 2 types de mutations sur les exons 14 et 17. L'instauration du traitement a permis une réponse hématologique rapide, en revanche il n'y a pas eu d'amélioration clinique (asthénie). L'augmentation de posologie du Ruxolitinib avait été mal tolérée. A l'arrêt du traitement, la neutrophilie avait réapparu mais une nouvelle réponse hématologique avait été obtenue à la reprise du traitement. En parallèle de l'amélioration hématologique, il était observé une diminution de la charge allélique des 2 mutations en PCR au cours des 9 mois de réponse. Au moment de la rechute, la charge allélique était revenue au niveau d'avant traitement. Les mécanismes de perte de réponse aux inhibiteurs de JAK ne sont pas connus à ce jour. Acquérir une réponse moléculaire semble important mais on ne sait pas si la diminution de charge allélique médiée par les inhibiteurs de JAK va modifier l'histoire naturelle de la maladie.

Une mutation de SETBP1 associée à celle de CSF3R pourrait entraîner une résistance au Ruxolitinib (48), la population ciblable pourrait donc être très restreinte (38% d'association).

d. CSF3R et leucémogénèse / Coopération oncogénique

Des mutations d'ASXL1 (57%) et de SETBP1 (38%) ont été retrouvées en association aux mutations de CSF3R dans la LCN. Le rôle exact de ces mutations n'est pas connu mais une coopération sous clonale est une hypothèse probable.

Les mutations d'ASXL1 étaient un facteur indépendant de mauvais pronostic, comme cela avait déjà été retrouvé dans la LMMC (88), d'ailleurs les patients LCN évoluant vers une LMMC étaient mutés ASXL1. Les mutations de SETBP1 n'ont pas été retrouvées comme un facteur influençant la survie globale, mais les patients ayant développé une LAM présentaient une mutation de SETBP1 (80). Des mutations récurrentes de SETBP1 sont détectées également dans les LAM secondaires, mais jamais dans les LAM *de novo* (89) suggérant qu'elles pourraient permettre la transition d'un état pré-leucémique à une leucémie. De plus, les mutations de SETBP1 ont été impliquées dans leur capacité à immortaliser les progéniteurs hématopoïétiques (89), mais on ne sait pas quel est le mécanisme exact de coopération oncogénique avec CSF3R.

V) Leucémie myéloïde chronique atypique (LMCa)

a. Description/présentation de la maladie

Ce syndrome myéloprolifératif atypique est rare et, comme son nom l'indique, a une présentation proche de la LMC, mais sans chromosome Philadelphie en cytogénétique standard ni réarrangement BCR-ABL en PCR (critère d'exclusion). Le diagnostic différentiel avec les autres

SMD/SMP Phi- peut être difficile (LMMC, LCN, syndromes frontières inclassifiables). Les autres critères comprennent une leucocytose > 13G/L, une myélémie >10% des leucocytes, l'absence de réarrangement PDGFR, une basophilie < 2% des leucocytes (en faveur d'une LMC), absence ou faible monocytose < 10% des leucocytes (en faveur d'une LMMC), une hypercellularité médullaire et l'exclusion d'une LAM (Figure 10).

Figure 10 : Critères OMS 2016 de la LMC atypique

• Peripheral blood leukocytosis (WBC $\geq 13 \times 10^9/L$) due to increased numbers of neutrophils and their precursors with prominent dysgranulopoiesis
• Neutrophil precursors (promyelocytes, myelocytes, metamyelocytes) $\geq 10\%$ of leukocytes
• No Ph chromosome or <i>BCR-ABL1</i> fusion gene and not meeting criteria for PV, ET, or PMF*
• No evidence of <i>PDGFRA</i> , <i>PDGFRB</i> , <i>FGFR1</i> rearrangement, or <i>PCMI-JAK2</i>
• Minimal absolute basophilia; basophils usually <2% of leukocytes
• No or minimal absolute monocytosis; monocytes usually < 10% of leukocytes
• Hypercellular bone marrow with granulocytic proliferation and granulocytic dysplasia, with or without dysplasia in the erythroid and megakaryocytic lineages
• Less than 20% blasts in the blood and bone marrow

L'analogie avec la LMC est basée sur l'hyperplasie médullaire de la lignée myéloïde et au niveau sanguin sur une hyperleucocytose avec une immaturité de la lignée myéloïde. Mais sur le plan morphologique, contrairement à la LMC, la LMC atypique est caractérisée par une lignée granuleuse dysplasique voire une dysplasie multi lignée (7,87). La présence de > 10% de cellules myéloïdes immatures dans le sang est un bon critère pour distinguer LMCa et LCN, cette dernière ne présentant pas cette particularité.

La médiane de survie est de l'ordre de 25 mois (91), moins dans d'autres études. La leucocytose, le pourcentage de myélémie, le sexe féminin et l'âge avancé semblent être des facteurs de mauvais pronostic.

Contrairement à la LMC, il n'existe pas d'anomalie génétique unique, les mutations identifiées sont retrouvées dans les autres hémopathies

myéloïdes. Des mutations sont retrouvées dans plus de 20% des cas : SETBP1, ASXL1, N/K-RAS, SRSF2, TET2, d'autres dans <10% des cas : CBL, CSF3R, JAK2 et ETNK1 (89,93).

b. Physiopathologie

Les mutations de SETBP1 sont identifiées dans 25 à 33% des cas. SETBP1 interagit avec SET, un régulateur négatif de la protéine phosphatase 2A (PP2A) ayant un rôle suppresseur de tumeur. SETBP1 protège SET d'être clivé par une protéase, augmentant la quantité de SET disponible pour réprimer l'activité de PP2A. Les mutations de SETBP1 empêchent la phosphorylation qui aboutit physiologiquement à la liaison de l'E3 ubiquitine ligase et donc la dégradation de SETBP1 par le protéasome. La mutation entraîne donc une augmentation de SETBP1 et de SET, diminuant l'activité de PP2A ce qui augmente la prolifération cellulaire. Les mutations de SETBP1 ne sont pas spécifiques de la LMCa, on les retrouve dans la LCN et la LMMC.

La mutation de CSF3R T618I est retrouvée dans <10% des cas, sa détection oriente plus vers le diagnostic de LCN. La mutation T640N décrite dans un cas de neutrophilie héréditaire (83) a été décrite chez un patient ayant un SMD qui a secondairement évolué vers un tableau de LMCa (94). Rarement, ont aussi été décrits des cas de LMCa avec des mutations de CSF3R aboutissant à un récepteur tronqué, comme celles des NCS. Un cas de SMP inclassable a évolué vers une LMCa présentait l'association d'une mutation juxta-membranaire (T618I) et d'une mutation du domaine C-terminal (Q739*) (95).

Des mutations de ETKN1 ont été identifiées dans 9% des cas de LMCa (49), il s'agit de 2 mutations récurrentes sur l'exon 4, N244 et H243, qui affectent la fonction catalytique de cette éthanolamine kinase.

c. Traitement

Il n'existe aucun standard de traitement pour cette pathologie rare dont le diagnostic est difficile. Les critères de traitement ne sont pas non plus établis, bien qu'une leucocytose rapidement progressive, une anémie et/ou une thrombopénie, une splénomégalie symptomatique ou des symptômes généraux doivent pousser à initier un traitement rapidement.

Etant donné le mauvais pronostic, une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques doit être envisagée s'il existe un donneur compatible et que les co-morbidités le permettent (96) bien que les données soient minces, en effet, la plus grosse cohorte à ce jour comprend 9 patients (97). Des facteurs de risque de mauvais pronostic moléculaires comme SETBP1 ou ASXL1 doivent peut-être faire considérer cette option plus tôt.

Les agents hypométhylants donnent des taux de réponse de 25 à 70% (30-40% en moyenne) avec une survie globale de 12 à 37 mois. Ils peuvent être proposés en attendant l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques pour les patients éligibles ou pour les patients non éligibles qui n'ont pas de possibilité de faire partie d'un essai clinique. Le peu d'études disponible ne permet pas d'en faire un standard de traitement.

L'inhibition de JAK par le Ruxolitinib peut être proposée pour les patients mutés CSF3R T618I ou JAK2V617F. L'essai de phase 2 présenté plus haut pour la LCN est également ouvert pour les patients atteints de LMCa. L'inclusion dans cet essai est possible quel que soit le statut mutationnel. Si l'inclusion n'est pas possible pour d'autres raisons, les auteurs recommandent d'utiliser le Ruxolitinib hors AMM seulement en cas de mutations de JAK2 ou de CSF3R (96). Une bonne réponse au Ruxolitinib a été rapportée dans un cas de LMCa (98).

Il existe des perspectives dans cette pathologie avec le Trametinib, un inhibiteur de la voie MEK kinase suite à la découverte d'une mutation de NRAS dans la LMCa avec une efficacité in vitro et in vivo (99).

La réactivation pharmacologique de PP2A qui est réprimée par la mutation de SETBP1 pourrait être une approche prometteuse avec la molécule Fingolimod (100,101).

VI) Leucémie aiguë myéloblastique

a. Présentation de la maladie

Une LAM correspond à une hémopathie maligne clonale qui résulte du blocage de différenciation au stade de blastes, qui sont par définition > 20% dans la moelle osseuse.

Cette pathologie hétérogène et complexe sur les plans cytogénétique et moléculaire ne sera pas détaillée dans ce chapitre en dehors du champ des LAM avec mutations de CSF3R, car cela nécessiterait un travail à part entière qui nous éloignerait trop du champ d'intérêt.

Les LAM avec mutations de CSF3R sont rares, et sont soit secondaires aux transformations de NCS (ou de façon plus générale à des syndromes avec insuffisance médullaire), de LCN ou de LMCa soit beaucoup plus rarement *de novo*. Les anomalies génétiques retrouvées dans un cas ou dans l'autre sont bien distinctes, par exemple des anomalies du chromosome 7 (monosomie) sont retrouvées dans 5% des LAM *de novo* versus 35 à 68% des LAM survenant dans un contexte de syndrome d'insuffisance médullaire, suggérant des mécanismes de leucémogénèse différents. Les mutations de CSF3R dans les LAM *de novo* sont rarissimes.

Les mutations de CSF3R retrouvées dans les LAM sont plus fréquentes dans les LAM pédiatriques (0,5% chez l'adulte versus >3% chez l'enfant) (78). Les LAM représentent 25% des leucémies de l'enfant et, contrairement aux LAL, leur pronostic reste mauvais avec un taux de rechutes d'environ 50% malgré la chimiothérapie intensive (102). Des mutations découvertes récemment dans les LAM pédiatriques sont

excessivement rares dans les LAM de l'adulte, suggérant là encore des mécanismes distincts (103).

Le taux de mutations de CSF3R dans les LAM secondaires aux NCS est de 78%, avec surtout des mutations aboutissant à un récepteur tronqué, comme cela a été détaillé dans le chapitre dédié aux NCS (37).

b. Physiopathologie

i. LAM *de novo*

Dans une étude du COG AAML 0531 et COG/NCI Target AML sur 787 cas de LAM pédiatriques, 3,6% des enfants présentaient une mutation de CSF3R. Les 2 classes de mutations étaient retrouvées (cytoplasmiques et juxta-membranaires) mais contrairement à la LCN où elles sont parfois simultanément présentes, elles semblent être mutuellement exclusives dans les LAM. Les mutations juxta-membranaires sont les plus fréquentes.

Dans cette cohorte, ces mutations étaient associées aux translocations (8,21) (32% versus 14%, $p=0,012$) et aux mutations CEBPA (35% versus 5%, $p<0,001$), donc aux groupes de risque favorable, avec 91% de survie à 5 ans chez les patients mutés pour CSF3R versus 64% pour ceux qui ne le sont pas ($p<0,001$) (104). La mutation de CEBPA est 8 fois plus fréquente dans le groupe de patients CSF3R mutés. Jusqu'à présent, les associations de mutations avec ASXL1, SETBP1 semblaient plutôt conférer un mauvais pronostic aux mutations de CSF3R ou en tout cas, elles étaient associées aux sous-groupes de mauvais pronostic, la valeur pronostique de la mutation elle-même n'est pas établie.

De façon étonnante, les expériences d'expression des 2 types de mutations dans les lignées Ba/F3 montrent que seules les mutations de type 1 avait un caractère oncogénique, alors que les résultats antérieurs étaient plutôt en faveur d'un rôle leucémogène beaucoup plus important pour les mutations de type 2.

La possibilité de cibler ces mutations par le Ruxolitinib dans les LAM avec mutations de CSF3R serait une perspective intéressante mais semble controversée. Une étude suggère que les mutations de CSF3R sont des événements sous-clonaux dans la LAM et que les cibler ne serait pas pertinent (105). Dans cette étude, l'association aux mutations de CEBPA est retrouvée, suivie de NRAS et ASXL1. L'impact pronostique n'est pas analysé.

Des analyses de *RNA sequencing* de 14 échantillons de LAM CEBPA double mutées (dm) confirment la haute fréquence de mutations de CSF3R (29%). Les mutations de CSF3R n'avaient jusqu'à présent pas été rapportées dans les LAM CEBPA dm et elles semblent fortement associées à ce sous-groupe puisque seulement 3 autres cas de mutations de CSF3R ont été mises en évidence sur la cohorte entière (3/14 versus 3/401, $p < 0,0001$). La mutation de CSF3R retrouvée dans les LAM CEBPA dm était la T618I alors que les 3 détectées dans les LAM non CEBPA étaient des mutations de type 1 non sens affectant le domaine cytoplasmique. CEBPA est un facteur de transcription exprimé dans les précurseurs myéloïdes précoces et dont l'expression augmente au cours de la maturation granulocytaire. Les mutations de CEBPA surviennent soit dans la partie N-terminale (effet dominant négatif) soit dans la partie C-terminale (mutations inactivatrices) de la protéine. La mutation de CEBPA, en bloquant la différenciation myéloïde, participe à la leucémogénèse. Les LAM mutées CEBPA sur les 2 allèles (mutations bialléliques) représentent un sous-groupe distinct caractérisé par un caryotype normal et un bon pronostic (106). Typiquement, il s'agit de l'association entre une mutation N-terminale et une dans le domaine C-terminal, mais d'autres combinaisons sont possibles. Il a été montré que CEBPA régule l'expression de CSF3R et dans un modèle murin, la délétion homozygote de CEBPA entraîne la perte sélective de CSF3R et un blocage complet de la différenciation granulocytaire (107,108). Dans les LAM CEBPA dm, il semble y avoir une réponse *in vitro* aux inhibiteurs de JAK et ce, quel que

soit le statut mutationnel de CSF3R, ce qui suggère une sensibilité générale à la voie JAK STAT dans ce sous-groupe de leucémie, avec une pression de sélection résultant peut-être d'une dépendance à la voie de signalisation JAK-STAT. Parmi les clones sensibles au Ruxolitinib, ceux exprimant la mutation T618I de CSF3R montrent la meilleure sensibilité au Ruxolitinib (109). L'autre anomalie génétique retrouvée chez les patients mutés CSF3R était les mutations du *core binding factor* (CBF), qui survenaient chez 37% des patients mutés pour CSF3R. Les LAM CBF comprennent les translocations (8,21) (RUNX1/RUNX1T1) et les inversions du chromosome 16 (inv 16), qui forment des complexes de fusion impliquant les sous-unités du CBF. Comme les mutations de CEBPA, les anomalies du CBF bloquent la différenciation des précurseurs myéloïdes et entraînent l'accumulation des blastes leucémiques. De façon intéressante, les mutations de CEBPA et les anomalies du CBF étaient mutuellement exclusives chez les patients ayant des mutations de CSF3R, les 2 ajoutées correspondant à 74% des cas CSF3R mutés.

Cela laisse penser qu'un signal de blocage de différenciation venant soit de CEBPA soit du complexe CBF, en association aux mutations de CSF3R, mène à la production de cellules myéloïdes immatures dans les LAM pédiatriques, alors que des mutations de CSF3R isolées mène plutôt à un phénotype de neutrophiles matures comme dans la LCN (110). Les mutations juxta-membranaires de CSF3R mises en évidence dans les LAM pédiatriques sont les mêmes que dans la LCN, donc en tout état de cause, des mutations différentes (CEBPA et SETBP1 par exemple) coopèrent pour aboutir à ces 2 pathologies distinctes.

Comme mentionné dans la partie détaillant la structure du récepteur, l'isoforme IV du récepteur, retrouvé dans les LAM *de novo* pédiatriques, est associé à une monosomie du chromosome 7 et confère donc un mauvais pronostic et une augmentation du risque de rechutes en cas de traitement par le G-CSF (10). Rappelons ici que dans l'isoforme IV, les 87

acides aminés du domaine C-terminal qui contiennent des séquences indispensables pour la différenciation, sont remplacés par une nouvelle séquence plus courte de 34 acides aminés dont la fonction reste inconnue. Les patients étaient randomisés pour recevoir du G-CSF après induction. L'administration de G-CSF dans ce contexte ciblerait les blastes surexprimant l'isoforme IV du récepteur et expliquerait l'incidence élevée de rechutes. Dans cette étude, il n'y avait pas d'autres facteurs de risque corrélé à la rechute après administration de G-CSF (leucocytose initiale, âge, classification FAB, cytogénétique). Les mutations de RAS, NPM1, c-KIT, WT1 et FLT3 n'avaient pas non plus d'impact sur l'incidence des rechutes chez ces patients. A noter que presque tous les patients avaient une MRD positive, même ceux en rémission hématologique complète, il est donc possible que chez tous les patients ayant reçu du G-CSF, il existait des blastes myéloïdes résiduels et que ces cellules étaient capables de répondre à l'administration de G-CSF. Les blastes myéloïdes répondent de façon variable au G-CSF, entraînant soit une prolifération soit une maturation granulocytaire. Ainsi, les blastes surexprimant l'isoforme IV pourraient répondre au G-CSF en proliférant sans pouvoir se différencier.

ii. SMD et LAM secondaires

Parmi les LAM secondaires aux NCS, une étude de NGS sur des patients NCS ayant développé une LAM a montré que les patients mutés CSF3R et RUNX1 développaient une LAM dans 65% des cas et un SMD dans 35% des cas, et pourraient être candidats à une allogreffe de cellules souches dès la détection de ces mutations. La mutation de CSF3R est un événement précoce et survient avant les mutations de RUNX1 (50). Il est possible qu'une ou 2 coopérations mutationnelles suffisent à générer le clone tumoral initiateur. Dans cette étude, l'hypothèse des auteurs est que la mutation initiatrice « driver » est celle de CSF3R et que les clones exprimant les CSF3R mutés ont un avantage de croissance et acquièrent

des mutations additionnelles qui coopèrent avec les précédentes (RUNX1 dans la majorité des cas) qui contribuent à l'initiation de la LAM et à la progression de la pathologie.

Concernant le traitement par G-CSF, l'interruption du traitement chez un patient suivi pour une NCS ayant co-acquis les mutations de CSF3R et de RUNX1 a entraîné la rapide disparition du clone muté en dessous du seuil de détection ; et la reprise du G-CSF a mené à l'expansion rapide de ce même clone et à la LAM (65). La disparition de clones CSF3R mutés avait déjà été rapportée (111). Contrairement aux études précédentes attribuant un rôle très controversé au traitement par G-CSF, les auteurs émettent l'hypothèse que les mutations de CSF3R surviennent probablement par hasard dans la CSH au cours de la NCS et sont présentes à un faible niveau, jusqu'à ce que ce clone devienne dominant sous G-CSF. Cependant, on ne peut exclure qu'un clone de CSH porte déjà la mutation de CSF3R très précocément après la naissance, sous le seuil de détection de nos méthodes de séquençage et que le traitement par G-CSF confère un avantage de croissance à ces cellules.

Une étude ancienne rapportait un taux de mutation de NRAS ou KRAS de 38% parmi les cas de LAM secondaires aux NCS (112). Mais des études plus récentes ont montré un taux de mutation de RAS bien plus faible de 7% (77) voire beaucoup moins (103). De façon intéressante, la plupart des patients de l'étude ancienne n'avaient pas reçu de traitement par du G-CSF dans l'enfance et ils étaient plus âgés. Par conséquent, il est possible que le traitement au long cours par le G-CSF sélectionne les cellules mutées pour CSF3R, diminuant le besoin de mutations de RAS pour la progression de la maladie car possédant déjà un avantage prolifératif. En accord avec cette hypothèse, le reséquençage de 3 des 5 cas de LAM secondaires à des NCS avec des mutations de RAS a confirmé l'absence de mutations de CSF3R chez ces patients mutés RAS. L'exclusion mutuelle des mutations activatrices de RAS et de CSF3R suggère que ces

gènes peuvent jouer un rôle dans les mêmes voies de signalisation cellulaires, cependant le seul patient muté RAS dans l'étude de Link et al avait aussi une mutation de CSF3R.

Globalement, les mutations retrouvées dans les LAM secondaires (aux NCS etc) s'apparentent à celles retrouvées dans LAM secondaires aux traitements (« therapy-related »), avec une association significative aux monosomies du chromosome 7 et sont donc de mauvais pronostic.

Les LAM *de novo* de l'enfant avec mutations de CSF3R sont en revanche associées à des facteurs de bon pronostic, avec une forte association aux mutations du CBF.

Les mutations de CSF3R dans les LAM n'ont vraisemblablement pas de valeur pronostique intrinsèque mais le pronostic dépend du contexte dans lequel elles surviennent et des mutations qui leur sont associées, avec les mutations de CSF3R survenant dans les LAM de novo avec une association significative aux groupes de bon pronostic d'une part, et les mutations de CSF3R retrouvées dans les LAM secondaires de mauvais pronostic d'autre part.

VII) Leucémie myélo-monocytaire chronique

a. Définition/Présentation de la maladie

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est le plus fréquent des syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques définis par l'organisme mondial de la santé (OMS). C'est une pathologie relativement rare (0,5 pour 100 000) qui affecte le plus souvent le sujet âgé (moyenne d'âge au diagnostic de 72 ans) et touche 2 fois plus l'homme que la femme.

Les critères diagnostiques ont été définis par l'OMS en 2008 : ils reposent sur la présence d'une monocytose supérieure à 1 G/L inexpliquée pendant au moins 3 mois ; lorsqu'ils existent, les signes de dysplasie cellulaire dans

la moelle facilitent le diagnostic. L'OMS recommande d'écarter une leucémie myéloïde chronique (gène de fusion BCR-ABL), un néoplasme lymphoïde ou myéloïde avec éosinophilie (réarrangement d'un gène PDGFR), et une leucémie aiguë (moins de 20% de blastes dans la moelle).

Il existe une anomalie cytogénétique clonale dans 30 à 40% des cas et il est bien établi qu'un caryotype complexe constitue un facteur de mauvais pronostic. La classification OMS distinguait les LMMC-1 (moins de 10% de blastes dans la moelle) des LMMC-2 (10-19% de blastes) qui sont plus graves. Auparavant, la classification FAB distinguait les formes prolifératives (leucocytes > 13G/L) des formes dysplasiques, les formes prolifératives étant de moins bon pronostic (113). Ces différences semblent liées aux anomalies de signalisation de la voie RAS/MAPK (114,115). Cette classification est controversée (116). Dans la classification de l'OMS révisée en 2016 (7), 3 groupes de pronostics différents se départagent en fonction du pourcentage de blastes : LMMC-0, <2% de blastes dans le sang périphérique et <5% de blastes médullaires, LMMC-1, blastes sanguins entre 2 et 4% et/ou blastes médullaires entre 5 et 9% et LMMC-2, 5 à 19% de blastes dans le sang périphérique et 10 à 19% dans la moelle osseuse et/ou quand des corps d'Auer sont présents. La maladie évolue de façon chronique mais la médiane de survie est faible, de l'ordre de 2,5 ans. Les décès sont liés aux complications des cytopénies et aux transformations en leucémie aiguë (25% des cas).

Récemment, a été identifié un autre paramètre susceptible d'aider au diagnostic : il s'agit d'une analyse des monocytes circulants en cytométrie en flux montrant une accumulation de monocytes classiques CD14+,CD16- (> 94%) au dépend des monocytes intermédiaires CD14+,CD16+ et non classiques CD14low, CD16+ (117).

Là encore, le seul traitement potentiellement curatif est l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques mais le taux de rechute après greffe

est élevé, et l'âge des patients et les co-morbidités qui en découlent en limitent l'indication. Les agents déméthylants permettent d'obtenir 40% de réponses dans les formes sévères de la maladie (118). Du fait de sa faible incidence et de l'absence de traitement spécifique, la maladie a longtemps été assimilée aux syndromes myélodysplasiques et traitée comme tels, notamment dans les essais cliniques. Ce n'est que récemment, avec l'avènement des approches génétiques de nouvelle génération, que cette maladie a connu un regain d'intérêt. Les progrès ces dernières années permettent d'envisager des approches thérapeutiques plus spécifiques.

b. Physiopathologie

i. Altérations génétiques identifiées dans le clone leucémique

L'analyse de l'exome complet des monocytes CD14+ de 49 patients atteints de LMMC a identifié 14 +/- 5 mutations par patient dans les séquences codantes du génome. Il s'agit le plus souvent de mutations ponctuelles, de type transition faux-sens.

Les 3 gènes les plus souvent mutés sont *TET2* (60%), *SRSF2* (50%), et *ASXL1* (40%). Des mutations de la voie Ras (*NRAS*, *KRAS*, *RIT1*, *CBL*, *PTPN11*) sont identifiées chez 15% des patients, ce qui est aussi le cas des mutations de *RUNX1* (souvent thrombopéniques). Les autres mutations récurrentes (une trentaine recensée) sont présentes dans moins de 10% des cas.

Les gènes mutés peuvent être regroupés en 4 catégories à l'intérieur desquelles les mutations sont souvent mutuellement exclusives : méthylation (*DNMT3A*) et déméthylation (*TET2*, *IDH1*, *IDH2*) des cytosines de l'ADN, structure de la chromatine (*ASXL1*, *EZH2*, *UTX*, *EED*, *SETBP1*), épissage des pré-ARN messagers (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*), et

signalisation intracellulaire (NRAS, KRAS, NF1, PTPN11, CBL, JAK2, FLT3, CSF3R).

La dominance clonale est précoce, affectant les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les mutations s'accumulent linéairement dans les cellules les plus immatures. Les cellules les plus mutées ont ensuite un avantage lors de la différenciation et constituent l'essentiel du clone dans le sang circulant.

Plusieurs facteurs semblent contribuer à l'amplification granulomonocytaire. Par exemple, la dominance clonale précoce des mutations perte de fonction de *TET2* génère un biais de différenciation granulomonocytaire aux dépens de la différenciation érythromégacaryocytaire. Les mutations des gènes de la signalisation (principalement la voie Ras) induisent une hypersensibilité des progéniteurs myéloïdes au GM-CSF, générant les formes prolifératives, mais la composante proliférative pourrait impliquer d'autres voies comme celle de CSF3R ou de FLT3. Un défaut de sensibilité des cellules matures à l'apoptose, dont le mécanisme moléculaire est encore en cours d'exploration, est un autre facteur pouvant contribuer à l'accumulation granulomonocytaire.

Les mutations du gène *ASXL1* affectent négativement le pronostic : il existe un score qui utilise des paramètres simples (âge, leucocytose, hémoglobine, plaquettes) et la présence ou l'absence de mutations d'*ASXL1* pour définir 3 catégories de patients à risque évolutif faible, intermédiaire, ou fort (88).

ii. La composante épigénétique de la maladie

Les mutations somatiques récurrentes identifiées dans la LMMC affectent très souvent des enzymes impliquées dans la régulation épigénétique. Le

lien entre altérations génétiques et épigénétiques (méthylation de l'ADN, modifications des histones) font l'objet de nombreuses investigations.

La maladie est associée à une hyperméthylation de l'ADN qui s'accroît avec la sévérité de la maladie (119,120). La méthylation de certains sites participe au phénotype malade. Par exemple, le promoteur du gène TIF1 γ (transcription intermediary factor 1) est hyperméthylé dans les cellules CD14 $^{+}$ de 40% des patients atteints de LMMC et, chez la souris, la délétion de ce gène dans les cellules myéloïdes induit un phénotype évoquant la LMMC ; il est donc probable que la méthylation du promoteur de ce gène participe au phénotype de la maladie.

L'expression de nombreux autres gènes est dérégulée dans les cellules leucémiques mais les mécanismes en cause – notamment le lien avec les mutations géniques - et les conséquences de cette dérégulation sont encore mal compris.

Comme nous l'avons indiqué plus haut, les agents déméthylants (analogues de nucléosides, azacytidine et décitabine) sont actuellement proposés dans le traitement des formes sévères de LMMC lorsque la greffe de cellules souches est impossible. Ces molécules sont incorporées dans l'ADN pendant la phase S du cycle cellulaire et interagissent avec les ADN méthyltransférases (DNMT) dont ils provoquent la dégradation par le protéasome. L'azacytidine est préférentiellement incorporée dans l'ARN, ce qui lui confère des propriétés spécifiques mal comprises.

Les agents déméthylants induisent une réponse, en l'occurrence une amélioration de l'hématopoïèse, chez 40% des patients. Lorsque cette réponse survient, le phénotype monocyttaire redevient normal (réapparition de monocytes intermédiaires et non classiques) et le gène TIF1 γ est ré-exprimé. Il s'agit de deux biomarqueurs de l'activité des agents déméthylants.

En revanche, la méthylation du promoteur du gène TIF1 γ – ou d'autres promoteurs - ne prédit pas la capacité des agents déméthylants à induire une bonne réponse thérapeutique. Une signature faite de 167 régions différemment méthylées a été récemment décrite et ces régions sont principalement localisées dans les régions « enhancers », à distance des promoteurs (121).

iii. Les anomalies de CSF3R

Parmi les cellules identifiées comme des monocytes par les cytologistes se trouve une fraction variable de cellules granuleuses immatures et dysplasiques, qui sont absentes chez les sujets sains du même âge (122). Ces cellules répondent à la définition de cellules myéloïdes suppressives décrites dans d'autres contextes pathologiques. Elles ont la particularité d'appartenir au clone leucémique : les mutations présentes dans les monocytes sont également présentes dans ces cellules granuleuses.

Le G-CSF étant le principal facteur de croissance impliqué dans la survie, la prolifération et la différenciation des cellules granuleuses. Son récepteur est CSF3R, exprimé sur les progéniteurs granulomonocytaires, les cellules granuleuses et les monocytes.

Des mutations de CSF3R ont aussi été identifiées dans les monocytes de patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique. Les conséquences fonctionnelles des mutations de CSF3R observées dans cette pathologie restent méconnues : s'agit-il de mutations « driver » contribuant à la prolifération des cellules du clone ou de mutations « passagères » sans impact fort sur l'évolution du clone ? C'est à cette question que je me suis efforcée de répondre et qui fera l'objet du chapitre suivant.

c. Mutations de CSF3R identifiées dans la LMCC

A partir d'un cas index dont nous avons séquencé l'exome complet, nous avons récemment identifié des mutations somatiques de CSF3R (N=6) chez environ 4% d'une série de 196 patients atteints de LMMC (123). Des fibroblastes cutanés ou des lymphocytes CD3+ ont été utilisés pour valider le caractère acquis des variants identifiés. L'une des mutations (M696T), identifiée chez 3 patients, est localisée dans le domaine intracytoplasmique du récepteur. Les autres (E450fs ; P467S et W547X) affectent la partie extracellulaire du récepteur. Certains variants se sont avérés être des polymorphismes et en l'absence de matériel constitutif, d'autres n'ont pas pu être classés.

Nous avons étudié la place des mutations de CSF3R dans l'architecture clonale chez un de ces patients et avons eu la surprise d'observer que la mutation de CSF3R précédait celles de TET2 et celle de SRSF2 puis l'apparition d'une mutation de JAK2. Des recombinaisons homologues expliquaient probablement la perte de l'allèle muté dans certains sous-clones et sa présence à l'état homozygote dans d'autres sous-clones (123). La plupart des mutations validées de CSF3R étaient associées à une mutation d'ASXL1 (cette association a également été observée dans la leucémie chronique à neutrophiles) (80) et les mutations de CSF3R semblaient être de mauvais pronostic. Ces observations constituent le socle du travail de recherche détaillé ci-après.

Une autre mutation de CSF3R vient d'être mise en évidence dans la LMMC : P733T. Ce travail chinois analyse les mutations de CSF3R, SRSF2 et SETBP1 chez 56 patients atteints de LMMC et 10 LCN. On retrouve des mutations de CSF3R dans 80% des cas (7 patients sur 10 ont une mutation T618I et 1 P733T) dont 2 présentent également une mutation de type 1. L'association des mutations de CSF3R et SETBP1 sont retrouvées dans 7% des LCN et 5% des LMMC. SRSF2 est muté chez 25% des LMMC. Cette mutation P733T jamais rapportée auparavant est retrouvée dans 7% des LMMC et elle semble mutuellement exclusive des

mutations de SRSF2, sous réserve du petit nombre de patients analysés. Elle pourrait être un marqueur diagnostique intéressant chez les patients LMMC SRSF2 WT. La mutation de SRSF2 confère un mauvais pronostic avec une survie globale et une survie sans progression plus courte (124). Dans ce travail, les mutations de CSF3R semblent montrer une tendance à un bon pronostic (résultats non significatifs), contrairement aux conclusions d'autres auteurs (123), mais notons que dans les deux cas, les effectifs analysés étaient faibles, ces conclusions ne peuvent pas encore être définitives. Il est intéressant de noter que cette mutations P733T n'est ni une mutation de type 1 ni une mutation de type 2, ses conséquences fonctionnelles ne sont pas encore connues.

VIII) Etude des conséquences fonctionnelles des mutations de CSF3R dans la LMMC

a. Projet

Parmi les mutations identifiées chez les patients atteints de LMMC, deux (E450fs et W547X) ont été écartées d'emblée car elles sont isolées et entraînent une perte d'expression du récepteur (en induisant l'apparition d'un codon stop prématuré dans la partie extracellulaire) et non son activation. Il n'est pas exclu que les cellules synthétisent alors (et éventuellement secrètent) un récepteur tronqué mais il est peu probable qu'une telle forme induise une activation constitutive de la signalisation cellulaire.

En revanche, la mutation somatique M696T (exon 17 du gène *CSF3R*) identifiée chez 3 patients atteints de LMMC et la mutation P467S du domaine extracellulaire du récepteur détectée chez un quatrième patient ne devraient pas prévenir l'expression du récepteur et pourraient avoir un impact sur son activation. Le but de mon travail de recherche est de cloner ces formes mutées de *CSF3R*, de les exprimer dans des cellules

humaines, et de tester l'impact des mutations sur la signalisation en présence et en l'absence de G-CSF.

b. Méthodes

i. Mutagenèse dirigée

1. PCR pour réaliser la mutagenèse dirigée

L'isoforme 1 du récepteur sauvage avait été clonée dans le plasmide pMIGR (pMIGR CSF3R isoforme 1 SAUVAGE) par une des équipes du laboratoire de l'IGR. Une étiquette HA avait été insérée au début de la séquence afin de faciliter la détection des constructions en Western Blot ou cytométrie en flux. Nous avons introduit les mutations d'intérêt lors d'une amplification du gène par polymérisation en chaîne (PCR). Cette PCR a été réalisée en mélangeant 1,25µL de chacune des amorces spécifiques sens et antisens (10 µM) (cf tableau), 0,25µL d'une polymérase haute fidélité (Q5 Hot Start High Fidelity, NEB), 5µL du tampon 5X associé, 0,5µL de dNTPs (10 mM), 0,5µL de DMSO (2%), 12,5ng du vecteur, le tout complété par de l'eau pour un volume final de 25µL. Un contrôle avec de l'eau seule a été utilisé pour valider la spécificité de la PCR et la non contamination. Le programme de PCR est le suivant (protocole NEB) : dénaturation initiale 30 sec à 98°C, 25 cycles : 10 sec à 98°C, 30 sec à 72°C, 210 sec à 72°C, extension finale 2 min à 72°C puis 10°C à l'infini. Le produit d'amplification correspondant au pMIGR contenant le mutant a été vérifié sur gel d'agarose (1%).

2. KLD (Kinase Ligase DpnI) et transformation des bactéries chimiocompétentes

1 µL du produit d'amplification de 8742 pb est mélangé à 5 µL de tampon 2X KLD Reaction Buffer, à 1 µL d'enzyme KLD (10X) complété avec 3 µL d'eau et incubé 5 min à température ambiante. Le but de la KLD est de recirculariser le plasmide d'intérêt et d'éliminer le plasmide de départ. 5 µL de cette réaction KLD sont ensuite mélangés à 50 µL de bactéries chimiocompétentes (*E coli*/DH5α, Invitrogen) puis incubés dans la glace une demi-heure. Un choc thermique pendant 30 secondes à 42°C est ensuite réalisé, puis les bactéries transformées sont remises immédiatement dans la glace pendant 5 minutes. Après 1h d'agitation à 37°C dans 1 mL du milieu de culture SOC, les bactéries sont étalées sur des boîtes de Petri contenant de l'agar dans du milieu LB supplémenté par de l'ampicilline (100 µg/mL) et laissées à 37°C pendant la nuit. Le lendemain 8 colonies sont prélevées et ensemencées dans 2 mL de milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et cultivées sous agitation à 4g pendant une nuit à 37°C.

Les plasmides sont purifiés par MiniPrep selon QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). L'objectif est de vérifier que la bactérie a bien été transformée par le vecteur, et que celui-ci contient l'insert voulu et bien orienté dans le sens 5'-3'.

Les colonies de bactéries déposées dans le milieu LB - ampicilline 0,1mg/mL ont proliféré pendant la nuit. 1,5 mL de ce milieu contenant les bactéries est prélevé et centrifugé 5 min 18000g dans un microtube. Le culot est resuspendu avec 250µL de tampon P1 puis 250µL de tampon P2 puis 350µL de tampon de neutralisation N3 permettant la lyse de bactéries puis centrifugé 10 min à 18000g. Le surnageant est déposé sur une colonne. Après centrifugation, la colonne est lavée puis séchée par une centrifugation additionnelle. L'élution des vecteurs d'intérêt est réalisée par ajout de 50µL d'eau stérile et centrifugation. La quantité d'ADN obtenue est mesurée au NanoDrop.

3. Midi Prep en utilisant les bactéries STABL3

100 ng du pMIGR CSF3R P467S issus des Mini Preps, 100 ng du pMIGR CSF3R SAUVAGE ou 100ng du mutant T640N de CSF3R dans pMIGR (contrôle positif) fourni par Isabelle Plo ont été mis dans 50 µL de bactéries chimiocompétentes STABL3 décongelées. Après 5 minutes d'incubation dans la glace, un choc thermique de 40 secondes à 40°C est réalisé. Après 1h d'agitation à 37°C dans 300 µL de milieu SOC, 10 µL de bactéries sont étalées sur des boîtes de Petri contenant de l'agar dans du milieu LB supplémenté par de l'ampicilline (100 µg/mL) et laissées à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, 8 colonies sont piquées et cultivées toute la journée dans 2 mL de LB ampicilline à 37°C. Le soir, 200 µL de ces minicultures sont ajoutés à 50 mL de LB ampicilline dans un erlenmeyer et incubés toute la nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain, on réalise des Midi Preps sur colonnes selon le protocole NucleoBond® Extra Midi (Macherey Nagel). L'ensemble des bactéries contenues dans le milieu est centrifugé à 5000g 15min et 4°C puis traitées pour Midi Prep. Le culot est resuspendu avec 8mL de tampon RES contenant de la RNase puis mélangé par inversion successivement avec 8mL de tampon de lyse et 8mL de tampon de neutralisation avant d'être à nouveau centrifugé 15 min à 5000g et 4°C. Le surnageant est déposé sur une colonne préalablement équilibrée avec 12 mL de tampon d'équilibration. La colonne est lavée avec 5 mL de tampon d'équilibration puis 8mL de tampon de lavage puis posée sur un tube à élution. L'ADN plasmidique est récupéré avec 5mL de tampon d'élution puis précipité avec 3,5 mL d'isopropanol et centrifugé 30 min à 15000g et 4°C. Le surnageant est jeté et le culot d'ADN plasmidique est repris avec 1,5mL d'éthanol à 70% dans un microtube pour être centrifugé 5 min à 15000g à température ambiante. Le surnageant est jeté et le culot d'ADN séché est resuspendu dans 50 à 100 µL d'eau stérile et dosé (NanoDrop).

- ii. Clonage dans le plasmide pcDNA3.1/V5-His TOPO® (plasmide intermédiaire)

1. Digestion par NotI et XbaI et extraction du gel d'agarose

Le plasmide pMIGR semblant empêcher la réaction de PCR, nous avons décidé de digérer le plasmide par les enzymes de restriction NotI et XbaI qui reconnaissent des sites de part et d'autre de la séquence du CSF3R. Afin d'obtenir un produit d'ADNc pur, excluant les ADNc simples brins et les amorces non utilisées, la bande d'intérêt est découpée du gel d'agarose ayant servi à sa migration et l'ADNc est extrait (kit Qiaquick Gel Extraction, Qiagen). Le fragment d'agarose découpé et contenant l'ADNc d'intérêt est chauffé à 50°C pendant 15 minutes en présence d'un tampon QG en vortexant régulièrement. Le produit de dissolution est déposé sur une colonne et centrifugé 1min à 16000g. L'éluat est jeté et 750 µL de tampon de lavage BE est déposé sur la colonne, centrifugée 1 min à 16000g. La colonne est séchée par une nouvelle centrifugation 1min à 16000g. 50 µL d'eau stérile sont déposés au centre de la colonne permettant l'élution de l'ADNc par centrifugation à 16000g, 1min. La quantité d'ADNc de chaque CSF3R ainsi purifié est mesurée au NanoDrop.

2. PCR

50ng des produits de digestion par NotI et XbaI sont mélangés à 1µL des amorces sens contenant le site de restriction Mlu I et antisens contenant le site de restriction Nhe I (10 µM) pour pouvoir cloner ensuite dans PRRL, 0,5µL d'Herculase (Agilent) (compatible avec la Taq de chez Invitrogen qui permettra de rajouter des A en 3' en fin de réaction), 0,4µL de dNTP (100 mM), 5µL de Tampon Herculase 5X, 0,5µL de DMSO, complété avec de l'eau pour avoir 25µL au final. L'amorce sens contient également une séquence consensus Kozak qui aide au démarrage de la traduction. Le programme de PCR est le suivant : 3 min à 98°C, 30 sec à 98°C, 30 sec à 64°C, 2 min à 72°C, 7 min à 72°C, et 10°C à l'infini, pendant 25 cycles. Enfin, 1 µL de Taq (Invitrogen) est ajouté aux 25µL et incubé 10 min à 72°C.

3. Clonage dans pcDNA3.1/V5-His TOPO®

Quatre μL de produit PCR sont mélangés avec $1\mu\text{L}$ de Salt Solution et $1\mu\text{L}$ de pcDNA3.1/V5-His TOPO®vector. Le mélange est incubé 30 min à température ambiante car les produits de PCR sont supérieurs à 1 kb. Les transformations des bactéries chimiocompétentes Top TenOneShot® sont réalisées selon le même protocole décrit dans le paragraphe b.i.2.

iii. Clonage dans le PRRL

Une digestion du TOPO-CSF3R (SAUVAGE/P467S/T640N) par les enzymes de restriction Mlu I et Nhe I est réalisée, suivie d'une migration des produits de digestion sur un gel d'agarose à 1%, découpe des bandes au scalpel et purification des bandes d'intérêt (2511 pb) en utilisant QIAquick Gel Extraction Kit Protocol comme décrit en 2.1. La ligation est réalisée avec $1\mu\text{L}$ de T4 DNA ligase, $2\mu\text{L}$ de Tampon 10X, avec un rapport de 3 ou 5 pour le PRRL digéré par Mlu I /Nhe I et 1 pour les différents inserts avec une incubation à température ambiante d'une heure. Les transformations dans les bactéries chimiocompétentes Xgold sont ensuite réalisées après avoir ajouté $1\mu\text{L}$ de 6- β -mercapto-ethanol.

iv. Vérification des différentes constructions par séquençage Sanger

L'ADN à séquencer (300 ng) est mélangé à $1\mu\text{L}$ d'enzyme et de nucléotides couplés à des fluorochromes (BigDye, Life Technologies), $2\mu\text{L}$ de tampon 5X, $0,5\mu\text{L}$ d'amorce ($10\mu\text{M}$) spécifique de la zone à séquencer. La PCR est réalisée selon le schéma suivant : 96°C 1 min, 96°C 10 secondes, 50°C 5 secondes, 60°C 4 minutes pour 25 cycles puis 10°C ∞ . Les produits de PCR sont ensuite transférés dans une plaque 96 puits à fond rond auxquels sont ajoutés $10\mu\text{L}$ de billes X Terminator et $45\mu\text{L}$ de tampon SAM (Life Technologies). Le mélange est agité à 100g pendant 30 min (IKA MS3, Digital) et transféré sur une plaque de séquençage qui est centrifugée 2min à 200g puis insérée dans le

séquenceur (3130xl Genetic Analyzer, AppliedBiosystems HITACHI). Les séquences obtenues sont alignées et comparées à celles des séquences théoriques des différentes constructions.

v. RT qPCR

1. Extraction des ARN

L'extraction se fait à partir des culots secs congelés à -80°C à l'aide du kit RNeasy Mini Kit. 20 μL à 2M de DTT est dilué dans 1 mL de Buffer RIT, 350 μL de ce mélange est ajouté directement sur chaque culot sec le plus rapidement possible après décongélation. Puis on ajoute 350 μL d'éthanol 70%, on mélange en pipetant sans centrifuger. On transfère 700 μL de chaque culot sur une colonne RNeasy puis on centrifuge 15 secondes à 8000 g à température ambiante, on jette le surnageant. On réalise une digestion à la DNase en ajoutant 350 μL de Buffer RWI sur la colonne, puis on centrifuge 15 secondes à 8000 g à température ambiante, on jette le surnageant. On ajoute 10 μL de DNase dans 70 μL de Buffer RDD, on centrifuge selon les mêmes modalités. On ajoute ces 80 μL sur la colonne et on laisse 15 minutes à température ambiante, puis de nouveau 350 μL de Buffer RWI et même protocole de centrifugation. On ajoute 500 μL de Buffer RPE 2 fois sur la colonne, avec une centrifugation entre les deux aux mêmes modalités, la dernière est de 2 minutes. On transfère la colonne dans un tube neuf et on centrifuge 5 minutes à vitesse maximale. Enfin on ajoute 30 μL d'eau RNase free sur la colonne avant de centrifuger 1 minute à 8000 g pour éluer l'ARN, puis on dose au Nanodrop.

2. Rétrotranscription

Une rétrotranscription a été effectuée avec la reverse transcriptase SuperScript II (200U/ μL , Invitrogen®) : 0.5 μg d'ARN totaux ont été incubés à température ambiante avec 1 μL d'amorces aléatoires (Random Primers Invitrogen®, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) durant cinq minutes pour effectuer une pré-hybridation. Un mélange contenant 4 μL de tampon de réaction (5X), 2 μL

d'eau « RNase free », 1µL d'inhibiteur de RNase (RNase OUT, 40U/µl), 1µL de rétrotranscriptase, 2µL de DTT (0.1M) et 4µL de dNTPs (25mM) a ensuite été ajouté dans chaque puits. Les échantillons ont été incubés dans un thermocycleur durant 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C. Les ADNc obtenus ont été dilués en ajoutant 100µl puis 2µL par puits sont directement analysés par PCR quantitative.

3. qPCR

La réaction de qPCR se déroule en triplicate dans des plaques 96 puits (Thermo-fast 96 Detection Plate AB-1100, Thermo Scientific). Le Mix contenant la SYBR Green (dilution ½ Power Sybr Green PCR Master Mix, AppliedBiosystems) est déposé dans chaque puits de même que les amorces spécifiques sens et antisens (cf tableau) diluées dans de l'eau (125nM final pour chaque amorce). Les ADNc sont ensuite ajoutés. De plus, pour chaque réaction, un contrôle est réalisé sans ADNc (afin de visualiser une éventuelle contamination ou une auto-hybridation des amorces). L'expression des gènes cibles est normalisée en utilisant les 3 gènes de ménage suivants (*GUS*, *PPIA*, *β2M*). Un film optique est placé sur la plaque avant d'être centrifugée, avant d'être placée dans le thermocycleur (7500 Real Time PCR System, AppliedBiosystems). Après chauffage de la plaque à 50°C 2 minutes puis 95°C 10 minutes afin d'activer l'enzyme, 45 cycles sont réalisés (95°C 15 secondes, 60°C 1 minute, l'hybridation et l'élongation s'effectuant à la même température et les résultats normalisés par rapport à un gène de ménage, par la méthode des $\Delta\Delta C_t$.

vi. Expérience sur les cellules 293T transfectées avec TOPO CSF3R (WT, P467S et T640N)

1. Ensemencement des cellules 293T pour transfection

La lignée cellulaire HEK 293T est issue de cellules de la corticale rénale d'embryon humain. Ces cellules adhérentes, qui ont été utilisées dans ce travail pour la production virale, sont cultivées dans du DMEM (Invitrogen®) contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Hyclone®), 1% de L-glutamine, et 1% de pénicilline (100U/mL) - streptomycine (100mg/mL).

On prépare pour chaque construction 7 puits (analyse FACS, analyse WB, 5 conditions de cinétique (T0 (cellules déprivées), 10 min, 30 min, 1h, 2h de G-CSF) + 2 puits avec cellules non transfectées. On dépose environ 200 000 cellules/puits.

2. Transfection transitoire des 293T par TOPO CSF3R (WT, P467S, T640N)

On change le milieu pour du DMEM seul. On dilue 800 ng de plasmide dans 50µL de DMEM (Invitrogen) seul, puis on ajoute 52µL de milieu + lipofectamine 2000 diluée 1/25^{ème} (Invitrogen) par plasmide et on laisse 20 min à température ambiante. On ajoute ensuite 100 µL du mélange précédent sur les cellules 293T. On agite doucement la plaque puis on incube à 37°C, et on change de milieu pour DMEM seul 4 à 6h après.

3. Cytométrie en flux

Les cellules sont centrifugées 5 min à 300g puis reprises dans du PBS à 1.10^6 cellules/ml (lavage). Un blocage des récepteurs Fc est réalisé en ajoutant du Fc block (Miltenyi) dilué au 1/20ème. Les cellules sont lavées puis les anticorps sont ajoutés dilués au 1/100ème : CD114-APC et anti-tag HA-PE (Miltenyi). Les cellules sont incubées 20 min à 4°C puis lavées et reprises dans 300µL de PBS avant leur passage au cytomètre (Fortessa, BD).

1. Expérience de cinétique avec du G-CSF sur les différentes constructions

Le but est de rechercher une activation constitutive chez le mutant P467S comparé au SAUVAGE (contrôle négatif) et au mutant T640N (contrôle positif). Le protocole d'ensemencement des 293T est décrit en 6.1. On change le milieu 4 à 6h après pour du DMEM seul afin de dépriver les cellules.

Chaque construction est mise en contact avec 20 ng/μL de G-CSF pendant 0 min (T0), 10 min, 30 min, 1h et 2h. Puis congélation des culots secs après lavage à -80°C.

2. Extraction des protéines des culots secs des 293T

Les culots secs conservés à -80°C ont été transportés dans un bloc -20°C, et un mélange de 96μL de Laemmli sample buffer 2X (bioRad®) et 4μL d'inhibiteurs de protéases pour 3 millions de cellules a immédiatement été ajouté. Du DTT (100ng/mL) a été ajouté dans chaque tube, puis les échantillons ont été dénaturés à 95°C pendant dix minutes, et conservés à -20°C.

3. Western Blot

Le niveau d'expression des protéines a été étudié par immunoempreinte après buvardage (ou Western blot). Les extraits protéiques dénaturés ont été décongelés dans la glace et séparés selon leur poids moléculaire par migration sur un gel de polyacrylamide (gradient de 4 à 12%) (Criterion XT, Biorad®) dans un tampon de migration XT MOPS (BioRad®). Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose (TechnoBioscience, Pierce®) pendant 1h30 sous 30 Volts dans un tampon de transfert (100ml de tampon Tris-Glycine 10X, Euromedex®, 200mL d'éthanol à 96°C, eau déminéralisée pour un volume final de 1L).

A la fin du transfert, une coloration de la membrane a été faite au rouge Ponceau pour s'assurer de la présence de protéines. Après lavage, les sites non spécifiques ont été saturés à l'aide d'une solution de BSA diluée à 5% dans du PBS 1X-Tween 0.1%, durant 40 minutes sur agitateur.

L'anticorps primaire, dilué au 1/1000^{ème} dans une solution de BSA 5% PBS1X-Tween 0.1%, a été ajouté pour hybridation spécifique sur la nuit, à 4°C, avec agitation. Les anticorps primaires utilisés dans ce travail sont des anticorps monoclonaux de souris et de lapin : anti-P-STAT3 (Cell Signaling®), anti-P-STAT5 (Cell Signaling®), anti-β-actine (Sigma®) et anti-P-ERK (Cell Signaling®), anti-P-AKT, anti-G-CSFR (Sigma®), anti-P-JAK2 (Cell Signaling®).

Le lendemain, trois lavages ont été effectués dans du PBS 1X-Tween 0.1% durant 15 minutes. L'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire, et couplé à la peroxydase de Raifort, a été dilué au 1/1000^e dans une solution de BSA 5% PBS1X-Tween 0.1% puis ajouté sur la membrane durant une heure, à température ambiante, sur agitateur. Trois lavages successifs de 15 minutes ont à nouveau été réalisés dans du PBS 1X-Tween 0.1%, et la membrane a été révélée par chimiluminescence à l'aide du réactif d'ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Miliport®) et d'une caméra (ImageQuant®).

vii. Transfection et transduction

1. Construction des lentivecteurs

La séquence du génome viral est répartie sur 3 plasmides différents : l'un joue le rôle de génome et comporte les séquences *cis* permettant sa mobilisation, ainsi qu'une cassette contenant un gène rapporteur (ici l'eGFP: enhanced Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur CMV. Un deuxième plasmide contient un gène d'enveloppe (ici la protéine G du VSV permettant un large tropisme cellulaire). Enfin un troisième plasmide code les gènes *gag* et *pro-pol* des protéines de structure et des enzymes virales respectivement.

La transfection de ces 3 plasmides dans une lignée cellulaire productrice de vecteurs permet la formation de particules contenant toutes les

protéines virales présentes chez le virus sauvage alors que le génome encapsidé ne code que le gène rapporteur. Les cellules cibles transduites par les vecteurs produits expriment donc uniquement le gène rapporteur.

2. Transfection des 293T pour production des particules virales

Quatre jours avant la production lentivirale, 500 000 cellules 293T ont été placées dans 20 mL de milieu DMEM complété (10% de SVF décomplémenté, 1% de pénicilline-streptomycine et 1% de L-glutamine) dans des flasques 75cm². 133µL de généticine ont été ajoutés dans chaque flasque. Le jour de la transfection, les 20 mL de milieu complété ont été remplacés par 11 mL de milieu DMEM, avec 10% de SVF, 1% de L-glutamine, sans antibiotique.

Nous avons alors préparé un mélange de 500 µL de Jet prime buffer (Polyplus Transfection ®) pour 10 µg d'ADN plasmidique total auquel nous avons ajouté, après agitation (vortex pendant 10 secondes) 20 µL de Jet prime reagent (Polyplus Transfection ®). Ce mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante, et 500 µL ont été ajoutés dans chaque flasque goutte à goutte, en remuant doucement.

Les cellules 293T transfectées ont été portées dans le laboratoire L3. Le deuxième jour de transfection, le milieu de culture a été changé. Le troisième jour, le surnageant de culture est centrifugé 10 minutes à 845g puis le recueil des particules lentivirales dans le surnageant est effectué par ultracentrifugation à 22 000 g 1h à 4°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé 1 minute à 2350g, puis les particules sont resuspendues dans du PBS et conservées à -80°C.

3. Transduction des UT7

Les lignées UT7 sont transduites avec les lentivecteurs avec une MOI de 1 avec le PRRL CSF3R SAUVAGE, PRRL CSF3R T640N, PRRL CSF3R

P467S et le PRRL vide. 600 μ L d'UT7 à 1.5×10^6 cellules/mL sont mises dans une plaque 12 puits, on y ajoute 200 μ L de virus avec du milieu MEM α 10% SVF. Les cellules sont laissées en culture durant 3 jours avant d'être triées sur leur expression de la GFP en cytométrie (Influx).

c. Résultats

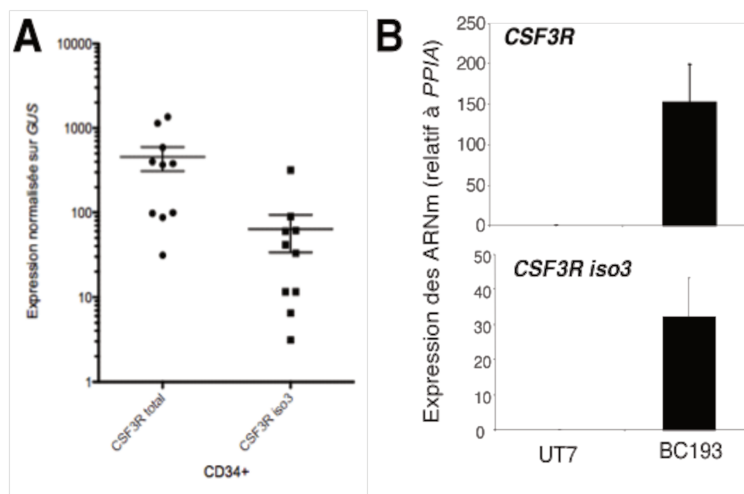
- i. Etude de l'expression de l'isoforme 3 du CSF3R dans les progéniteurs hématopoïétiques et expression de CSF3R dans la lignée d'étude (UT7)

Le résidu M696T n'est exprimé que sur l'isoforme 3 de CSF3R. Comparée à l'isoforme 1, l'isoforme 3 comporte 27 acides aminés supplémentaires entre les positions 680 et 707. La mutation M696T identifiée chez les patients atteints de LMMC affecte donc uniquement l'isoforme 3. Cette isoforme est exprimée majoritairement dans les cellules placentaires. Nous avons au sein du laboratoire des ARN totaux extraits de cellules CD34⁺ et congelés à -80°C. Ma première expérience a consisté, après avoir vérifié la qualité de ces ARNs, à rétro-transcrire les ARN de 10 échantillons CD34⁺ provenant de donneurs sains pour vérifier la présence de cette isoforme dans les progéniteurs hématopoïétiques par RT-qPCR et de comparer son expression à celle détectée avec des amorces communes à toutes les isoformes de CSF3R (Figure 11A). Les résultats ont été normalisés avec trois gènes de ménage (*GUS*, *PPIA* et β 2M) et des résultats similaires ont été obtenus avec ces 3 contrôles. L'isoforme 3 (CSF3R iso3) est exprimée de façon significative dans tous les échantillons.

Cette approche nous a permis également de vérifier l'absence du récepteur du G-CSF dans les cellules de la lignée UT7 (Figure 11B), les ARN ayant été extraits à partir d'un culot sec. Les ARN extraits de cellules mononuclées issues d'un buffy coat (BC193) ont servi de contrôle positif. L'utilisation d'amorces reconnaissant toutes les isoformes (*CSF3R*) ou

seulement l'isoforme 3 (*CSF3R iso3*) nous a permis de vérifier que cette lignée n'exprimait pas du tout ce récepteur, par ailleurs bien détecté dans notre contrôle. Cette lignée a donc été sélectionnée pour tester l'impact des mutations M696T et P467S sur l'état d'activation de CSF3R.

Figure 11 : Etude de l'expression de CSF3R et de son isoforme 3 par RT-qPCR A : RT-qPCR de CSF3R total et de l'isoforme 3 normalisée sur le gène GUS dans les cellules CD34+, B : RT-qPCR de CSF3R et de l'isoforme 3 dans lignée UT7 et dans les PBMC contrôles.



ii. Mutagenèse dirigée

Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées pour générer l'isoforme 1 portant les mutations P467S et T640N à partir de CSF3R sauvage isoforme 1 étiquetée HA dans la construction pMIGR et pour générer l'isoforme 3 (en 2 étapes pour insérer 81 nucléotides supplémentaires) et sa version mutée M696T. Les mutations P467S, dans le domaine extra-cellulaire de l'isoforme 1, et M696T, dans le domaine intra-cellulaire de l'isoforme 3, sont les mutations étudiées. Le mutant T640N dans le domaine transmembranaire est le contrôle positif dont on sait qu'il induit la dimérisation et l'activation constitutive du récepteur (83) (Figure 12A).

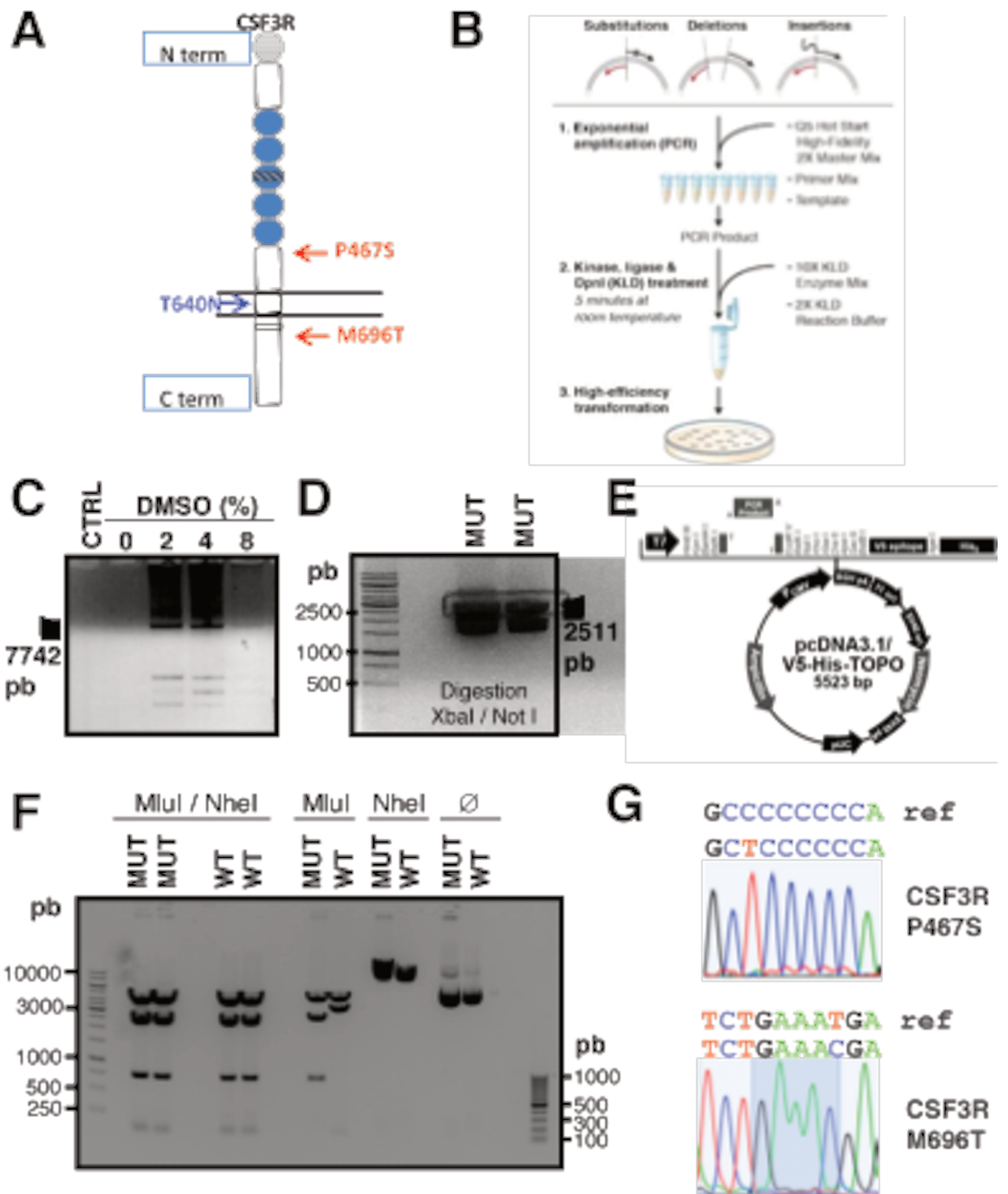
La stratégie de mutagenèse est résumée dans la Figure 12 B. La séquence de *CSF3R* est riche en GC et nécessite l'ajout de DMSO pour réaliser la PCR afin d'éviter la formation de structures secondaires. La migration du produit de PCR (gamme de DMSO de 0 à 8%) a mis en évidence une bande de 7742 pb correspondant au vecteur pMIGR (6231 pb) contenant *CSF3R* muté P467S (2511 pb) (Figure 12C). Il a été nécessaire de digérer pMIGR *CSF3R* par les enzymes de restriction Not I et Xba I dont les sites se trouvent de part et d'autre de la séquence de *CSF3R* (6 nucléotides en amont et 9 nucléotides en aval respectivement) afin d'ajouter les sites de restriction Mlu I et Nhe I. Ces sites ont permis le clonage direct du gène dans le PRRL.

La bande à 2511 pb correspondant à *CSF3R* sauvage ou muté (Figure 12D) a été extraite du gel, purifiée, et amplifiée avec les amorces contenant les sites Mlu I et Nhe I. *CSF3R* sauvage et ses différentes versions mutées ont ensuite été clonés dans le plasmide intermédiaire pcDNA3.1-TOPO (Figure 12E). Le clonage dans PRRL a été réalisé en digérant les différentes constructions TOPO *CSF3R* par Mlu I et Nhe I. Puis, grâce à l'action de la T4 DNA ligase, le transgène purifié à partir du gel d'agarose (bande à 2546 pb correspondant à *CSF3R* + sites de restriction Mlu I et Nhe I + séquence Kozak + nucléotides ajoutés aléatoirement de part et d'autre pour faciliter l'action des enzymes de restriction) (Figure 12F) a été inséré dans PRRL digéré par les mêmes enzymes.

Les résultats du séquençage confirment l'introduction des différentes versions de *CSF3R* dans PRRL, incluant les 2 mutants dans lesquels une sérine (CCC) remplace une proline (TCC) en position 467 et une thréonine (ACG) remplace une méthionine (ATG) sur l'isoforme 3 en position 696 (Figure 12G). Après amplification par Midi Prep (cf paragraphe b.i.3), les différentes constructions ont été digérées par BamHI afin de s'assurer que le profil obtenu était bien celui attendu et les plasmides non digérés ont

également été déposés sur gel pour vérifier qu'ils n'étaient pas dégradés avant toute utilisation.

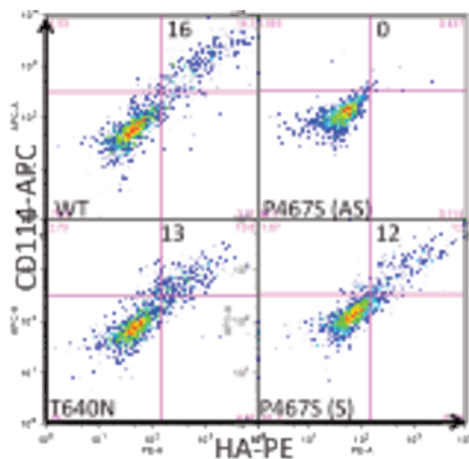
Figure 12 : Résumé des étapes de mutagenèse dirigée : A : Schéma de CSF3R avec les mutations à générer en rouge et mutation contrôle en bleu, B : Stratégie de mutagenèse, C : Gel d'agarose à 1% après PCR de mutagenèse pour P467S. La flèche indique la bande d'intérêt, D : Digestion de pMIGR CSF3R par NotI et XbaI pour réaliser la PCR pour sous-cloner, E : Schéma du plasmide intermédiaire pcDNA3.1/V5-His TOPO®, F : Gel d'agarose à 1% après digestion de TOPO-CSF3R MUT et WT par MluI et/ou NheI, G : Séquençage de la zone mutée pour les mutants P467S et M696T.



iii. Expériences de transfection transitoire (TOPO®CSF3R) dans les lignées 293T

La lignée cellulaire 293T a été transfectée transitoirement avec pcDNA3.1/TOPO-CSF3R-Sauvage ou -P467S ou -T640N. Une analyse par cytométrie en flux avec cellules marquées par l'anticorps anti-CD114 couplé à l'APC et l'anticorps anti-TagHA couplé au PE (phycoérythrine) montre 12 à 16% de cellules transfectées qui expriment CSF3R (population double positive). La transfection avec la construction P467S (AS) ne montre pas d'expression du récepteur car la séquence est insérée en antisens contrairement à P467S (S) en orientation sens exprimant le récepteur étiqueté (Figure 13, carré en haut à droite versus en bas à droite). Même si le taux de transfection est faible, cette expérience nous a permis de tester l'efficacité de l'anticorps anti-CD114 en APC (Apocyanine) qui ne fonctionnait pas sur les cellules primaires. Le transgène inséré dans le TOPO en antisens nous permet d'avoir un contrôle négatif.

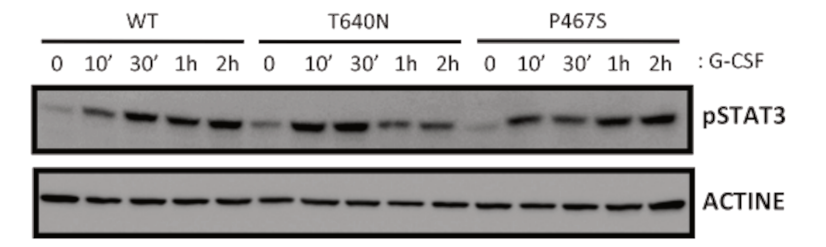
Figure 13 : Efficacité des transfections transitoires en utilisant pcDNA3.1/TOPO contenant CSF3R-WT, CSF3R P467S (en orientation antisens ou sens) et CSF3R T640N. Cytométrie en flux avec marquage anti-CD114-APC en ordonnée et anti-HA-PE en abscisse dans les cellules 293T transfectées transitoirement avec les constructions indiquées après 24 heures.



Une étude de cinétique avec du G-CSF à la concentration de 20ng/mL a été réalisée sur les cellules 293T transfectées transitoirement avec pcDNA3.1/TOPO-CSF3R-WT ou -P467S ou -T640N. Les cellules ont été déprivées, c'est-à-dire mises dans un milieu sans sérum pendant une nuit (0), puis soumises à l'effet du G-CSF pendant 10 minutes (10'), 30 minutes

(30'), 1 heure (1h) et 2 heures (2h) (Figure 14). Nous avons étudié l'état de phosphorylation de STAT3 (pSTAT3) après stimulation par du G-CSF à la concentration de 20 ng/ml dans les 3 conditions. Comme précédemment démontré (83), le mutant T640N induit une faible phosphorylation de STAT3 à l'état basal comparé à CSF3R contrôle, avec une forte phosphorylation après 10 minutes de stimulation par du G-CSF, phosphorylation maintenue après 30 minutes puis disparaissant progressivement. Le mutant P467S n'induit pas de phosphorylation basale de STAT3 par rapport à CSFR3 contrôle (Figure 14) et après 30 minutes de stimulation par du G-CSF, cette phosphorylation est moins forte que le contrôle.

Figure 14 : Etude de phospho-STAT3 par Western Blot en utilisant des extraits protéiques provenant des cellules 293T transfectées transitoirement avec pcDNA3.1/TOPO contenant CSF3R-WT (WT), pcDNA3.1/TOPO contenant CSF3R-T640N (T640N) ou pcDNA3.1/TOPO contenant CSF3R-P467S (P467S). Chaque construction a été étudiée en condition de déprivation une nuit dans du milieu seul (0), en présence de G-CSF 20 ng/mL pendant 10 minutes (10'), 30 minutes (30'), une heure (1h) et 2 heures (2h). La phosphorylation de STAT3 (pSTAT3) est montrée ainsi que le marqueur de charge (ACTINE).

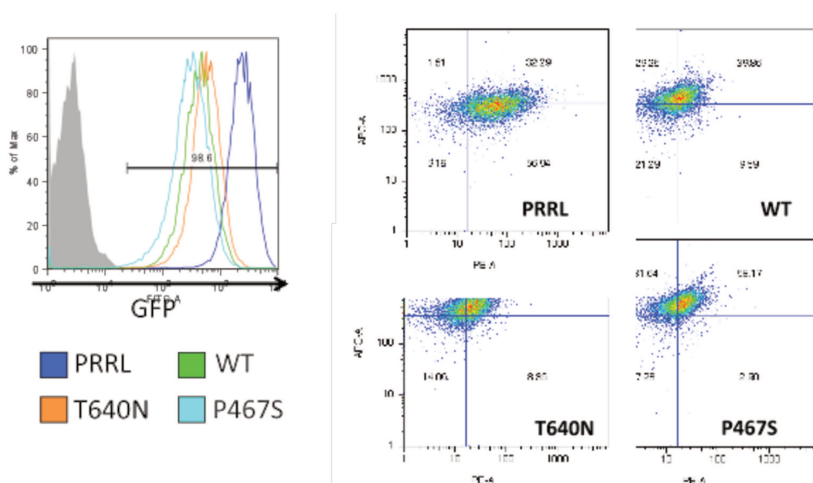


iv. Transduction des UT7

La lignée UT7 a été transduite avec les constructions PRRL vide, PRRL-CSF3R-WT, PRRL-CSF3R-P467S et PRRL-CSF3R-T640N afin d'étudier les conséquences fonctionnelles de la mutation P467S. Le vecteur PRRL

vide a été utilisé comme contrôle négatif et PRRL-CSF3R-T640N comme contrôle positif (faible activation constitutive du récepteur). Les MOI pour chaque construction ont été déterminées afin d'obtenir un taux de transduction proche de 100% dans les cellules UT7. Une MOI de 0.5 a été utilisée pour PRRL vide et une MOI de 1 a été utilisée pour les 3 constructions contenant *CSF3R*. L'efficacité de transduction des cellules UT7 a été déterminée grâce à l'expression de la GFP (Figure 15A). Le vecteur PRRL vide a été plus fortement transduit que les 3 PRRL contenant *CSF3R-WT*, *CSF3R-T640N* et *CSF3R-P467S* dont l'efficacité de transduction est très semblable. Nous avons ensuite étudié le taux d'expression des différentes constructions mais la compensation entre les canaux pour la GFP et le PE doit être optimisée, la compensation utilisée ne permettant pas de conclure.

Figure 15 : Efficacité des transductions des UT7 avec le PRRL seul, le PRRL-CSF3R-WT, le PRRL-CSF3R-P467S et le PRRL-T640N. A : Histogramme montrant l'efficacité des transductions par le marquage GFP, les cellules représentées en gris sont les cellules non transduites (GFP négatives) ; B : Cytométrie en flux avec marquage anti-CD114-APC en ordonnée et anti-HA-PE en abscisse dans les cellules UT7 transduites par le PRRL, le PRRL-CSF3R-WT, le PRRL-CSF3R-P467S et le PRRL-T640N

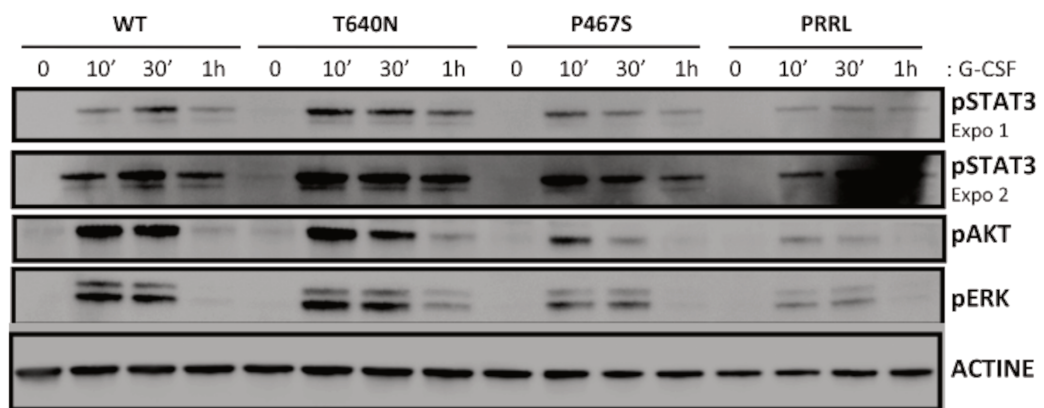


Si les résultats de cytométrie en flux étudiant l'étiquette HA dans le canal PE sont ininterprétables, l'étude du pourcentage des cellules exprimant CD114-APC suggère une différence entre les cellules UT7 transduites avec le vecteur PRRL vide (34% de cellules CD114+) et celles transduites avec les vecteurs PRRL-CSF3R-WT (60%), PRRL-CSF3R-T640N (77%) et PRRL-CSF3R-P467S (90%), suggérant que les différentes constructions de *CSF3R* sont exprimées à la surface des cellules UT7 (Figure15B). Cette expérience doit être refaite avec les compensations adaptées afin de déterminer le niveau d'expression exacte de CSF3R sauvage ou muté à la surface des cellules UT7. Cela nous permettra également de confirmer la spécificité de l'anticorps anti-CD114-APC. Une étude de cinétique avec du G-CSF à la concentration de 20ng/mL a été réalisée sur les cellules UT7 transduites avec les quatre constructions décrites ci-dessus. Les cellules ont été déprivées pendant une nuit (0), puis stimulées par du G-CSF pendant 10 minutes (10'), 30 minutes (30') et 1 heure (1h) (Figure 16). Le but était d'étudier la signalisation intracellulaire dans les 4 conditions par Western Blot, en regardant l'état de phosphorylation de STAT3 (pSTAT3), AKT (pAKT) et ERK (pERK) (l'analyse de pJAK2 a été un échec pour l'instant). Nous avons détecté, après une exposition prolongée, une faible activation constitutive de STAT3 par le mutant T640N (comparer les puits 0 de T640N versus 0 de CSF3R-WT et P467S sur l'exposition 2). En revanche, nous n'avons pas observé d'activation constitutive de ERK et AKT. En présence de G-CSF, les voies de signalisation s'activent de façon transitoire dans les 4 conditions. Cette activation semble plus forte et plus prolongée lorsque les cellules expriment le mutant CSF3R T640N (signal plus fort dans le puits 1h pour toutes les voies testées comparé aux autres constructions). Il est inattendu d'observer une activation des voies de signalisation dans les cellules transduites avec le vecteur PRRL vide : cette activation est beaucoup plus faible que celle observée dans les lignées transduites avec les différents récepteurs. Ces résultats encore préliminaires n'apportent

pas d'argument pour une activation constitutive de la signalisation lorsque le mutant CSF3R-P467S est exprimé. Dans les cellules transduites avec ce mutant, aucun signal n'est détecté en condition de déprivation et le signal en présence de G-CSF est plus faible qu'avec le récepteur sauvage pour toutes les voies étudiées.

Cette expérience sera renouvelée, incluant l'analyse de pJAK2 et de pSTAT5 ainsi que toutes les formes totales des différentes protéines (STAT3, AKT, ERK, JAK2). Le niveau d'expression de CSF3R sera également exploré par Western Blot.

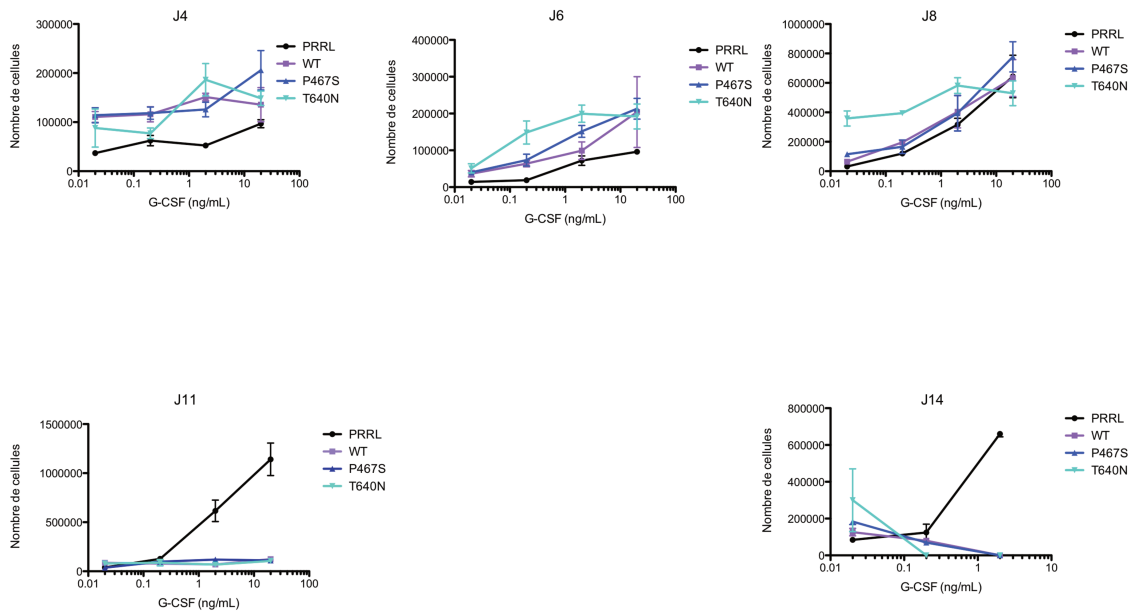
Figure 16 : Western Blot en utilisant des extraits protéiques provenant des cellules UT7 transduites avec le PRRL-CSF3R-WT, le PRRL-T640N, le PRRL-CSF3R-P467S et le PRRL seul pour étudier les voies de signalisation JAK-STAT, ERK et AKT. Chaque construction a été étudiée en condition de déprivation une nuit dans du milieu seul (0), en présence de G-CSF 20 ng/mL pendant 10 minutes (10'), 30 minutes (30'), une heure (1h). La phosphorylation de STAT3 (pSTAT3) est montrée à 2 expositions différentes ainsi que le marqueur de charge (ACTINE).



v. Tests de prolifération sur les sangs de cordon

Les PBMC de sang de cordon transduites avec le PRRL vide ou CSF3R WT ou CSF3R P467S ou CSF3R T640N (contrôle positif) (Figure 17A) ou CSF3R M696T (Figure 17B) ont été mis en culture sous concentration croissante de G-CSF et les cellules ont été comptées à J4, 6, 8, 11 et 14.

A



B

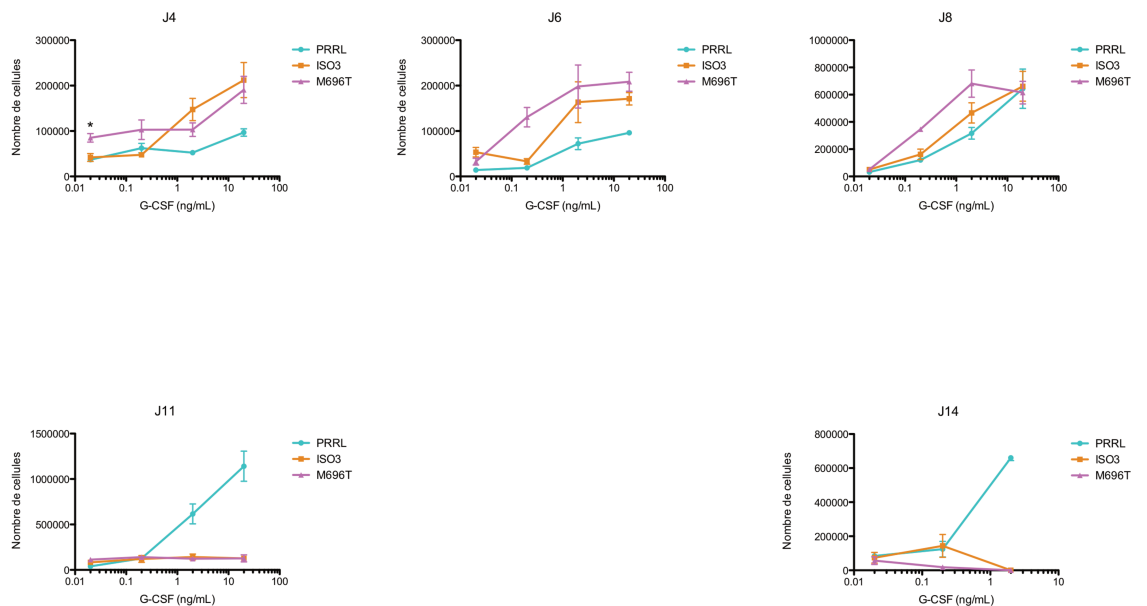


Figure 17 : Test de prolifération des cellules CD34 issues de sang de cordon transduites avec les différentes constructions, sous dose croissante de G-CSF (0,01 ; 0,1 ; 1 et 10 ng/mL).

Les cellules transduites avec le récepteur mutant T640N ne prolifèrent pas plus que les autres. De façon étonnante, les cellules transduites avec le PRRL vide prolifèrent beaucoup plus à partir de J11. Il ne semble pas y avoir de prolifération augmentée sur les 2 mutants étudiés (P467S et M69T) sous dose croissante de G-CSF, ce qui n'est ni en faveur d'une mutation entraînant une hypersensibilité au G-CSF (de type récepteur tronqué) ni en faveur d'une activation constitutive (de type mutation juxta-membranaire).

d. Conclusions du projet

Ce travail a montré que les progéniteurs hématopoïétiques exprimaient l'isoforme III du récepteur du G-CSF, justifiant d'explorer les conséquences fonctionnelles des mutations somatiques M696T identifiées dans les cellules leucémiques de 3 patients atteints de leucémie myélomonocytaire chronique. Nous avons cloné le gène et son isoforme 3 et obtenu les

mutants à étudier ainsi qu'un vecteur muté contrôle. Les expériences de transfection transitoire dans la lignée 293T ont montré l'expression de ces constructions. Les premières expériences de transduction réalisées dans la lignée humaine UT7 ne montrent pas d'activation constitutive des voies de signalisation étudiées en présence de la version de CSF3R portant une mutation P467S mais ces expériences préliminaires doivent être répétées et optimisées. Le mutant M696T ainsi que l'isoforme 3 sauvage ont ensuite été clonés dans le PRRL, puis les lentivirus produits. Nous avons transduit les cellules CD34 humaines pour évaluer l'impact de ces mutations sur la signalisation, sur la prolifération et sur la différenciation granulomonocytaire.

Au cours de ce projet, nous avons rencontré un certain nombre de difficultés : la séquence du vecteur pMIGR n'est pas connue de façon précise et de multiples étapes ont été nécessaires avant de réaliser les expériences de mutagenèse sur le transgène. L'insertion des 81 nucléotides a également été une étape délicate ; j'ai dû réaliser l'insertion en 2 étapes, en faisant des mises au point sur le schéma de PCR (temps d'élongation, températures d'hybridation et gammes de DMSO) avant d'obtenir les conditions optimales.

Le récepteur au G-CSF présente plusieurs isoformes qui sont mal répertoriées dans la littérature. Il en existerait 4, mais l'isoforme II correspondant au récepteur soluble a été retirée de la classification NCBI car il n'existe pas d'argument suffisant en faveur de son existence. Leur rôle n'est pas connu de façon précise. L'expression de l'isoforme IV a été corrélée à une augmentation du taux de rechute des leucémies aiguës myéloïdes pédiatriques (10) sans avoir d'impact sur la réponse au traitement des leucémies aiguës lymphoïdes pédiatriques (9). Cette corrélation a été attribuée à l'augmentation de la survie et de la prolifération des cellules souches exprimant l'isoforme IV du fait d'une activation plus importante de STAT5 et d'une augmentation de miR155 (13). L'isoforme III avait été identifiée dans les cellules placentaires et nous

montrons pour la première fois que cette isoforme III est exprimée dans les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺. Il serait utile d'explorer les différentes isoformes de CSF3R dans les cellules hématopoïétiques à diverses étapes de leur maturation.

Nous n'avons pas détecté d'activation constitutive du récepteur porteur de la mutation P467S. Nos résultats restent préliminaires. La poursuite des travaux ne semble pas en faveur de mutations de CSF3R activatrices de la signalisation. Ces mutations sont rares mais si pour les quelques patients porteurs de ces mutations, nous avons pu mettre en évidence une activation des voies de signalisations, ils auraient pu bénéficier de traitements ciblés par des inhibiteurs de kinases, justifiant alors la recherche systématique de la mutation chez les patients. Cette situation aurait été similaire à celle observée dans les monocytozes avec éosinophilie et réarrangement de *PDGFRA* qui sont sensibles à l'Imatinib. Des résultats préliminaires montrent que CSF3R est fortement exprimé à la surface des monocytes. Des expériences de cytométrie en flux réalisées dans le laboratoire montrent un taux d'expression du même ordre que celui retrouvé sur les cellules granuleuses. Des expériences de RNA-seq confirment que les ARNm de CSF3R sont exprimés dans les monocytes CD14⁺CD16⁻ de sujets sains ainsi que de patients atteints de LMMC. Son rôle à la surface des monocytes n'est pas établi et il serait intéressant d'investiguer sa fonction sur les monocytes normaux et pathologiques.

Une lettre publiée très récemment dans *Leukemia* suggère que le mutant CSF3R-M696T peut être un polymorphisme constitutif (125), les patients analysés dans cette étude ont d'ailleurs présenté une neutrophilie transitoire. Dans l'étude à l'origine de mon travail (123), il avait été vérifié que cette mutation était somatique et n'était notamment pas présente dans les lymphocytes CD3⁺ des patients. Les contrôles utilisés dans l'étude récemment publiée proviennent de frottis buccaux, lesquels peuvent être contaminés par des cellules hématopoïétiques (126). A la suite d'une

allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, par exemple, on retrouve dans le frottis buccal du receveur jusqu'à 50% de cellules du receveur (127). Des fibroblastes cutanés auraient été de meilleurs contrôles pour affirmer l'origine constitutive de ces variants. D'autre part, le caractère germinal d'un variant n'exclut pas son rôle activateur de la signalisation intra-cellulaire et une potentielle implication dans un processus de leucémogénèse (83).

IX) Conclusion/Discussion

Les mutations de CSF3R sont donc présentes dans la NCS avec une majorité de mutations aboutissant à un récepteur tronqué hypersensible au G-CSF, et dans des hémopathies myéloïdes chroniques, de type SMP atypiques (LCN et LMCa) où ce sont plutôt des mutations juxta-membranaires activatrices ; ou rarement dans les hémopathies myéloïdes aiguës de type LAM pédiatriques où les 2 mutations sont retrouvées, mais mutuellement exclusives.

Ces 2 principaux types de mutations ont des conséquences différentes, à savoir une hypersensibilité au G-CSF pour le récepteur tronqué et une activation de la voie de signalisation Src-kinase, et une activation constitutive du récepteur en l'absence du ligand pour les mutations juxta-membranaires avec une activation préférentielle de la voie JAK STAT. Une réponse respective aux inhibiteurs Dasatinib et Ruxolitinib a été montrée et permet d'espérer une avancée thérapeutique dans ces pathologies. Plus rarement, les mutations de CSF3R peuvent être inhibitrices quand elles surviennent dans le domaine extra-cellulaire.

Finalement, on peut peut-être distinguer plusieurs situations de survenue des mutations de CSF3R. Le premier contexte serait celui de pathologies où ces mutations activatrices seraient driver et permettraient de guider le traitement (LCN, NCS, quelques LAM, LMCa bien que ce soit plus controversé). Le deuxième cas de figure serait celui où ces mutations

indiquent une évolution de la maladie (passage d'une NCS à un SMD ou une LAM). Dans d'autres pathologies, telles que la LMMC, le rôle de ces mutations dans l'évolution de la maladie n'est pas bien établi, même si elles semblent apparaître précocément. Les données sur leur impact pronostiques sont contradictoires parce qu'elles sont rares et hétérogènes.

La question est de savoir si ces pathologies au pronostic sombre avec des possibilités thérapeutiques limitées pourraient bénéficier d'une prise en charge par une thérapie ciblée en fonction des mutations retrouvées. La faible incidence de ces pathologies rend difficile les essais cliniques, il en existe un en cours pour les LCN et les LMCA pour évaluer l'efficacité du Ruxolitinib, inhibiteur de JAK2, dans ces deux pathologies.

La balance entre bénéfices et risques du traitement par G-CSF est un sujet d'actualité dans diverses situations. Le G-CSF a démontré son efficacité dans le traitement de pathologies mettant en jeu le pronostic vital ou pour aider à la récupération médullaire après certains traitements, notamment d'aplasie post chimiothérapie. Cependant, les études montrent que les mutations du récepteur au G-CSF sont impliquées dans plusieurs pathologies, dont certaines pour lesquelles le G-CSF est administré comme traitement. Il a été émise l'hypothèse que l'utilisation du G-CSF dans la NCS pouvait contribuer à l'expansion sélective des clones portant des mutations de CSF3R entraînant un récepteur tronqué. Cela dit, comme évoqué à plusieurs reprises dans ce travail, les données sont complexes et il est difficile de tirer une conclusion claire et univoque à ce sujet. Une étude rapportait qu'il n'y avait pas de relation significative entre l'âge de survenue des SMD/LAM et la dose de G-CSF administrée ou la durée de traitement (128). En revanche, une autre étude suggérait que le risque de leucémie dans la NCS augmentait avec la dose de G-CSF (38), mais devoir augmenter les doses de ce traitement pourrait être expliqué par une pathologie sous-jacente, qui serait déjà intrinsèquement plus à risque d'évoluer vers un SMD ou une LAM. De plus, des patients NCS ont

développé une LAM avant l'ère du traitement par G-CSF dans cette pathologie. Un patient NCS a progressé vers une LMMC sans avoir été traité par G-CSF, mais il exprimait un récepteur tronqué (77). Il est donc possible que la forme mutée du récepteur ait un avantage sélectif en l'absence de traitement, possiblement en raison du taux de G-CSF endogène élevé qui résulte de la neutropénie (128). Cependant, le traitement par G-CSF n'est pas un facteur de risque dans les autres classes de mutations de CSF3R, comme celles qui sont retrouvées dans la LCN.

De nombreuses thérapies ciblées sont maintenant disponibles pour cibler les voies de signalisation dérégulées en aval de CSF3R, faisant espérer des traitements efficaces pour ces patients porteurs de mutations de CSF3R. En effet, des études récentes ont montré une efficacité en ciblant les signalisations aberrantes retrouvées spécifiquement dans les mutations de CSF3R « activatrices » (type T618I) et celles « hyper-réactives » (type récepteur tronqué). Il semble légitime de les rechercher devant tout SMP Phi-, JAK2-, sans réarrangement de PDGFR, même si à ce jour, la détection d'une mutation de CSF3R ne permet pas de proposer une thérapie ciblée hors protocole.

X) Bibliographie

1. Ravandi F. Role of cytokines in the treatment of acute leukemias: a review. *Leukemia*. 2006 Apr;20(4):563–71.
2. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med*. 2005 Mar;11(3):305–11.
3. Kuhlmann MT, Kirchhof P, Klocke R, Hasib L, Stypmann J, Fabritz L, et al. G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis. *J Exp Med*. 2006 Jan 23;203(1):87–97.
4. Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, et al. The

hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2083–98.

5. Savage DG, Antman KH. Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. *N Engl J Med*. 2002 Feb 28;346(9):683–93.

6. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Mar 13;348(11):994–1004.

7. 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.

8. Fleischman AG, Maxson JE, Luty SB, Agarwal A, Royer LR, Abel ML, et al. The CSF3R T618I mutation causes a lethal neutrophilic neoplasia in mice that is responsive to therapeutic JAK inhibition. *Blood*. 2013 Nov 21;122(22):3628–31.

9. Wu Y, Chen Y-Y, Chen Y-Z. [Expression of G-CSFR IV isoform in adult acute myeloid leukemia and its clinical significance]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui J Exp Hematol Chin Assoc Pathophysiol*. 2014 Aug;22(4):899–902.

10. Ehlers S, Herbst C, Zimmermann M, Scharn N, Germeshausen M, Neuhoﬀ N von, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Treatment of Childhood Acute Myeloid Leukemias That Overexpress the Differentiation-Defective G-CSF Receptor Isoform IV Is Associated With a Higher Incidence of Relapse. *J Clin Oncol*. 2010 May 20;28(15):2591–7.

11. Mehta HM, Futami M, Glaubach T, Lee DW, Andolina JR, Yang Q, et al. Alternatively spliced, truncated GCSF receptor promotes leukemogenic properties and sensitivity to JAK inhibition. *Leukemia*. 2014 May 1;28(5):1041–51.

12. Sloand EM, Yong ASM, Ramkissoon S, Solomou E, Bruno TC, Kim S, et al. Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Sep 26;103(39):14483–8.

13. Zhang H, Goudeva L, Immenschuh S, Schambach A, Skokowa J, Eiz-Vesper B, et al. miR-155 is associated with the leukemogenic potential of the class IV granulocyte colony-stimulating factor receptor in CD34⁺ progenitor cells. *Mol Med Camb Mass*. 2014;20:736–46.

14. Austin F, Mehta HM, Cheng C, Corey S. Mutations in the Spliceosome Lead to Alternative Splicing of CSF3R in Promoting Myelodysplastic Syndromes. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):1978–1978.

15. Avalos BR. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 1996 Aug 1;88(3):761–77.
16. Nicholson SE, Oates AC, Harpur AG, Ziemiecki A, Wilks AF, Layton JE. Tyrosine kinase JAK1 is associated with the granulocyte-colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine-phosphorylated after receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Apr 12;91(8):2985–8.
17. Tian SS, Lamb P, Seidel HM, Stein RB, Rosen J. Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1994 Sep 15;84(6):1760–4.
18. Zhu Q-S, Robinson LJ, Roginskaya V, Corey SJ. G-CSF-induced tyrosine phosphorylation of Gab2 is Lyn kinase dependent and associated with enhanced Akt and differentiative, not proliferative, responses. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3305–12.
19. Corey JL, Davidson N, Lester HA, Brecha N, Quick MW. Protein kinase C modulates the activity of a cloned gamma-aminobutyric acid transporter expressed in *Xenopus* oocytes via regulated subcellular redistribution of the transporter. *J Biol Chem*. 1994 May 20;269(20):14759–67.
20. Croker BA, Kiu H, Nicholson SE. SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Aug;19(4):414–22.
21. Carapeti M, Soede-Bobok A, Hochhaus A, Sill H, Touw IP, Goldman JM, et al. Rarity of dominant-negative mutations of the G-CSF receptor in patients with blast crisis of chronic myeloid leukemia or de novo acute leukemia. *Leukemia*. 1997 Jul;11(7):1005–8.
22. Beekman R, Touw IP. G-CSF and its receptor in myeloid malignancy. *Blood*. 2010 Jun 24;115(25):5131–6.
23. Touw IP, Palande K, Beekman R. Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling: implications for G-CSF responses and leukemic progression in severe congenital neutropenia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2013 Feb;27(1):61–73, viii.
24. Maxson JE, Luty SB, MacManiman JD, Abel ML, Druker BJ, Tyner JW. Ligand independence of the T618I mutation in the colony-stimulating factor 3 receptor (CSF3R) protein results from loss of O-linked glycosylation and increased receptor dimerization. *J Biol Chem*. 2014 Feb 28;289(9):5820–7.
25. Ding J, Komatsu H, Wakita A, Kato-Uranishi M, Ito M, Satoh A, et al. Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):4198–200.
26. Hughes SB, Spicciarich D, Press RD, Thompson SL, Radich JP, Bertozzi C, et al.

A Novel CSF3R Mutation Uncovers the Importance of Membrane-Proximal N-Glycosylation for Receptor Regulation. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):3141–3141.

27. Liongue C, Ward AC. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Mutations in Myeloid Malignancy. *Front Oncol* [Internet]. 2014 [cited 2017 Mar 6];4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00093/abstract>

28. Maxson JE, Gotlib J, Pollyea DA, Fleischman AG, Agarwal A, Eide CA, et al. Oncogenic CSF3R Mutations in Chronic Neutrophilic Leukemia and Atypical CML. *N Engl J Med*. 2013 May 9;368(19):1781–90.

29. Gits J, van Leeuwen D, Carroll HP, Touw IP, Ward AC. Multiple pathways contribute to the hyperproliferative responses from truncated granulocyte colony-stimulating factor receptors. *Leukemia*. 2006 Dec;20(12):2111–8.

30. Liu F, Kunter G, Krem MM, Eades WC, Cain JA, Tomasson MH, et al. Csf3r mutations in mice confer a strong clonal HSC advantage via activation of Stat5. *J Clin Invest*. 2008 Mar;118(3):946–55.

31. Lee C, Raz R, Gimeno R, Gertner R, Wistinghausen B, Takeshita K, et al. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity*. 2002 Jul;17(1):63–72.

32. Kamezaki K, Shimoda K, Numata A, Haro T, Kakumitsu H, Yoshie M, et al. Roles of Stat3 and ERK in G-CSF signaling. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2005 Feb;23(2):252–63.

33. Druhan LJ, Ai J, Massullo P, Kindwall-Keller T, Ranalli MA, Avalos BR. Novel mechanism of G-CSF refractoriness in patients with severe congenital neutropenia. *Blood*. 2005 Jan 15;105(2):584–91.

34. Ward AC, van Aesch YM, Gits J, Schelen AM, de Koning JP, van Leeuwen D, et al. Novel point mutation in the extracellular domain of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in a case of severe congenital neutropenia hyporesponsive to G-CSF treatment. *J Exp Med*. 1999 Aug 16;190(4):497–507.

35. Ward AC, Gits J, Majeed F, Aprikyan AA, Lewis RS, O’Sullivan LA, et al. Functional interaction between mutations in the granulocyte colony-stimulating factor receptor in severe congenital neutropenia. *Br J Haematol*. 2008 Aug;142(4):653–6.

36. Mahajan K, Mahajan NP. ACK1/TNK2 tyrosine kinase: molecular signaling and evolving role in cancers. *Oncogene*. 2015 Aug 6;34(32):4162–7.

37. Germeshausen M, Ballmaier M, Welte K. Incidence of CSF3R mutations in severe congenital neutropenia and relevance for leukemogenesis: Results of a long-term survey. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):93–9.

38. Donadieu J, Leblanc T, Bader Meunier B, Barkaoui M, Fenneteau O, Bertrand Y,

et al. Analysis of risk factors for myelodysplasias, leukemias and death from infection among patients with congenital neutropenia. Experience of the French Severe Chronic Neutropenia Study Group. *Haematologica*. 2005 Jan;90(1):45–53.

39. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, et al. The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4628–35.

40. Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, Navarro WH, Levine JE, Miller JP, et al. Lower risk for serious adverse events and no increased risk for cancer after PBSC vs BM donation. *Blood*. 2014 Jun 5;123(23):3655–63.

41. Hölig K, Kramer M, Kroschinsky F, Bornhäuser M, Mengling T, Schmidt AH, et al. Safety and efficacy of hematopoietic stem cell collection from mobilized peripheral blood in unrelated volunteers: 12 years of single-center experience in 3928 donors. *Blood*. 2009 Oct 29;114(18):3757–63.

42. Socie G. Response: G-CSF and aplastic anemia. *Blood*. 2007 May 15;109(10):4589–90.

43. Gurion R, Gafter-Gvili A, Paul M, Vidal L, Ben-Bassat I, Yeshurun M, et al. Hematopoietic growth factors in aplastic anemia patients treated with immunosuppressive therapy-systematic review and meta-analysis. *Haematologica*. 2009 May;94(5):712–9.

44. Locasciulli A, Arcese W, Locatelli F, Di Bona E, Bacigalupo A, Italian Aplastic Anaemia Study Group. Treatment of aplastic anaemia with granulocyte-colony stimulating factor and risk of malignancy. Italian Aplastic Anaemia Study Group. *Lancet Lond Engl*. 2001 Jan 6;357(9249):43–4.

45. Kojima S, Ohara A, Tsuchida M, Kudoh T, Hanada R, Okimoto Y, et al. Risk factors for evolution of acquired aplastic anemia into myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia after immunosuppressive therapy in children. *Blood*. 2002 Aug 1;100(3):786–90.

46. Zhu Q-S, Xia L, Mills GB, Lowell CA, Touw IP, Corey SJ. G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1847–56.

47. Zhang H, Schultz AR, Luty SB, Means S, David L, Klimek J, et al. Definition of the Minimal Truncated Elements Necessary for CSF3R Leukemogenic Potential. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):2735–2735.

48. Lasho TL, Mims A, Elliott MA, Finke C, Pardanani A, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia with concurrent CSF3R and SETBP1 mutations: single colony clonality studies, in vitro sensitivity to JAK inhibitors and lack of treatment response to ruxolitinib. *Leukemia*. 2014 Jun;28(6):1363–5.

49. Gambacorti-Passerini CB, Donadoni C, Parmiani A, Pirola A, Redaelli S, Signore G, et al. Recurrent ETNK1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2015 Jan 15;125(3):499–503.
50. Skokowa J, Steinemann D, Katsman-Kuipers JE, Zeidler C, Klimenkova O, Klimiankou M, et al. Cooperativity of RUNX1 and CSF3R mutations in severe congenital neutropenia: a unique pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*. 2014 Apr 3;123(14):2229–37.
51. Rosenberg PS, Zeidler C, Bolyard AA, Alter BP, Bonilla MA, Boxer LA, et al. Stable long-term risk of leukaemia in patients with severe congenital neutropenia maintained on G-CSF therapy. *Br J Haematol*. 2010 Jul 1;150(2):196–9.
52. Bux J, Behrens G, Jaeger G, Welte K. Diagnosis and Clinical Course of Autoimmune Neutropenia in Infancy: Analysis of 240 Cases. *Blood*. 1998 Jan 1;91(1):181–6.
53. Dale DC. Neutrophil elastase and neutropenia. *Blood*. 2004 Jun 1;103(11):3993–4.
54. Grenda DS, Murakami M, Ghatak J, Xia J, Boxer LA, Dale D, et al. Mutations of the ELA2 gene found in patients with severe congenital neutropenia induce the unfolded protein response and cellular apoptosis. *Blood*. 2007 Dec 15;110(13):4179–87.
55. Xia J, Link DC. Severe congenital neutropenia and the unfolded protein response. *Curr Opin Hematol*. 2008 Jan;15(1):1–7.
56. Qiu Y, Zhang Y, Hu N, Dong F. A Truncated Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor (G-CSFR) Inhibits Apoptosis Induced by Neutrophil Elastase G185R Mutant: IMPLICATION FOR UNDERSTANDING CSF3R GENE MUTATIONS IN SEVERE CONGENITAL NEUTROPENIA. *J Biol Chem*. 2017 Feb 24;292(8):3496–505.
57. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
58. Skokowa J, Cario G, Uenal M, Schambach A, Germeshausen M, Battmer K, et al. LEF-1 is crucial for neutrophil granulocytopoiesis and its expression is severely reduced in congenital neutropenia. *Nat Med*. 2006 Oct;12(10):1191–7.
59. Bonilla MA, Gillio AP, Ruggeiro M, Kernan NA, Brochstein JA, Abboud M, et al. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis. *N Engl J Med*. 1989 Jun 15;320(24):1574–80.
60. Dale DC, Bonilla MA, Davis MW, Nakanishi AM, Hammond WP, Kurtzberg J, et al. A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia. *Blood*. 1993 May 15;81(10):2496–502.

61. Welte K, Zeidler C, Dale DC. Severe congenital neutropenia. *Semin Hematol*. 2006 Jul;43(3):189–95.
62. Klimiankou M, Klimenkova O, Uenalan M, Zeidler A, Mellor-Heineke S, Kandabarau S, et al. GM-CSF stimulates granulopoiesis in a congenital neutropenia patient with loss-of-function biallelic heterozygous CSF3R mutations. *Blood*. 2015 Oct 8;126(15):1865–7.
63. Dong F, van Paassen M, van Buitenen C, Hoefsloot LH, Löwenberg B, Touw IP. A point mutation in the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) gene in a case of acute myeloid leukemia results in the overexpression of a novel G-CSF-R isoform. *Blood*. 1995 Feb 15;85(4):902–11.
64. Hermans MH, Antonissen C, Ward AC, Mayen AE, Ploemacher RE, Touw IP. Sustained receptor activation and hyperproliferation in response to granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in mice with a severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia-derived mutation in the G-CSF receptor gene. *J Exp Med*. 1999 Feb 15;189(4):683–92.
65. Klimiankou M, Mellor-Heineke S, Zeidler C, Welte K, Skokowa J. Role of CSF3R mutations in the pathomechanism of congenital neutropenia and secondary acute myeloid leukemia. *Ann N Y Acad Sci*. 2016 Apr;1370(1):119–25.
66. Kimura A, Kinjyo I, Matsumura Y, Mori H, Mashima R, Harada M, et al. SOCS3 is a physiological negative regulator for granulopoiesis and granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling. *J Biol Chem*. 2004 Feb 20;279(8):6905–10.
67. Touw IP, van de Geijn G-JM. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front Biosci J Virtual Libr*. 2007 Jan 1;12:800–15.
68. Bagby GC. Discovering early molecular determinants of leukemogenesis. *J Clin Invest*. 2008 Mar;118(3):847–50.
69. Moore MAS, Dorn DC, Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G. Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2007 Apr;35(4 Suppl 1):105–16.
70. Kunter G, Woloszynek JR, Link DC. A truncation mutant of Csf3r cooperates with PML-RAR α to induce acute myeloid leukemia in mice. *Exp Hematol*. 2011 Dec;39(12):1136–43.
71. Ancliff PJ, Gale RE, Liesner R, Hann I, Linch DC. Long-term follow-up of granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in patients with severe congenital neutropenia: implications for leukaemogenesis and therapy. *Br J Haematol*. 2003 Feb;120(4):685–90.

72. Germeshausen M, Kratz CP, Ballmaier M, Welte K. RAS and CSF3R mutations in severe congenital neutropenia. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3504–5.
73. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Amaral SM, Curley DP, et al. PML/RAR α and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci*. 2002 Jun 11;99(12):8283–8.
74. Germeshausen M, Ballmaier M, Schulze H, Welte K, Flohr T, Beiske K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in a patient with acute lymphoblastic leukemia secondary to severe congenital neutropenia. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):829–30.
75. Cassinat B, Bellanné-Chantelot C, Notz-Carrère A, Menot ML, Vaury C, Micheau M, et al. Screening for G-CSF receptor mutations in patients with secondary myeloid or lymphoid transformation of severe congenital neutropenia. A report from the French neutropenia register. *Leukemia*. 2004 Sep;18(9):1553–5.
76. Yetgin S, Germeshausen M, Touw I, Koç A, Olcay L. Acute lymphoblastic leukemia in a patient with congenital neutropenia without G-CSF-R and ELA2 mutations. *Leukemia*. 2005 Sep;19(9):1710–1.
77. Germeshausen M, Schulze H, Kratz C, Wilkens L, Repp R, Shannon K, et al. An acquired G-CSF receptor mutation results in increased proliferation of CMML cells from a patient with severe congenital neutropenia. *Leukemia*. 2005 Apr;19(4):611–7.
78. Beekman R, Valkhof MG, Sanders MA, van Strien PMH, Haanstra JR, Broeders L, et al. Sequential gain of mutations in severe congenital neutropenia progressing to acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 May 31;119(22):5071–7.
79. Elliott MA, Hanson CA, Dewald GW, Smoley SA, Lasho TL, Tefferi A. WHO-defined chronic neutrophilic leukemia: a long-term analysis of 12 cases and a critical review of the literature. *Leukemia*. 2005 Feb;19(2):313–7.
80. Elliott MA, Tefferi A. Chronic neutrophilic leukemia 2016: Update on diagnosis, molecular genetics, prognosis, and management. *Am J Hematol*. 2016 Mar;91(3):341–9.
81. Bain BJ, Ahmad S. Chronic neutrophilic leukaemia and plasma cell-related neutrophilic leukaemoid reactions. *Br J Haematol*. 2015 Nov;171(3):400–10.
82. Pardanani A, Lasho TL, Laborde RR, Elliott M, Hanson CA, Knudson RA, et al. CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1870–3.
83. Plo I, Zhang Y, Le Couédic J-P, Nakatake M, Boulet J-M, Itaya M, et al. An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia. *J Exp Med*. 2009 Aug 3;206(8):1701–7.
84. You W, Weisbrot IM. Chronic neutrophilic leukemia. Report of two cases and

review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 1979 Aug;72(2):233–42.

85. Böhm J, Schaefer HE. Chronic neutrophilic leukaemia: 14 new cases of an uncommon myeloproliferative disease. *J Clin Pathol*. 2002 Nov;55(11):862–4.

86. Kako S, Kanda Y, Sato T, Goyama S, Noda N, Shoda E, et al. Early relapse of JAK2 V617F-positive chronic neutrophilic leukemia with central nervous system infiltration after unrelated bone marrow transplantation. *Am J Hematol*. 2007 May;82(5):386–90.

87. Gunawan AS, McLornan DP, Wilkins B, Waghorn K, Hoade Y, Cross NCP, et al. Ruxolitinib, a potent JAK1/JAK2 inhibitor, induces temporary reductions in the allelic burden of concurrent CSF3R mutations in chronic neutrophilic leukemia. *Haematologica*. 2017 Mar 16;haematol.2017.163790.

88. Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, et al. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Jul 1;31(19):2428–36.

89. Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, et al. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):942–6.

90. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009 Jul 30;114(5):937–51.

91. Breccia M, Biondo F, Latagliata R, Carmosino I, Mandelli F, Alimena G. Identification of risk factors in atypical chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006 Nov;91(11):1566–8.

92. Dao K-HT, Tyner JW. What's different about atypical CML and chronic neutrophilic leukemia? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2015;2015:264–71.

93. Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014 Apr 24;123(17):2645–51.

94. Maxson JE, Luty SB, MacManiman JD, Paik JC, Gotlib J, Greenberg P, et al. The Colony-Stimulating Factor 3 Receptor T640N Mutation Is Oncogenic, Sensitive to JAK Inhibition, and Mimics T618I. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016 Feb 1;22(3):757–64.

95. Bartels S, Lehmann U, Büsche G, Schlue J, Hussein K, Debatin D, et al. De novo CSF3R mutation associated with transformation of myeloproliferative neoplasm to atypical CML. *Ann Hematol*. 2015 Jul;94(7):1255–6.

96. Gotlib J. How I treat atypical chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2016 Jan

1;blood-2016-08-693630.

97. Koldehoff M, Beelen DW, Trenchel R, Steckel NK, Peceny R, Ditschkowski M, et al. Outcome of hematopoietic stem cell transplantation in patients with atypical chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2004 Dec;34(12):1047–50.
98. Dao K-HT, Solti MB, Maxson JE, Winton EF, Press RD, Druker BJ, et al. Significant clinical response to JAK1/2 inhibition in a patient with CSF3R-T618I-positive atypical chronic myeloid leukemia. *Leuk Res Rep*. 2014;3(2):67–9.
99. Borthakur G, Popplewell L, Boyiadzis M, Foran J, Platzbecker U, Vey N, et al. Activity of the oral mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor trametinib in RAS-mutant relapsed or refractory myeloid malignancies. *Cancer*. 2016 15;122(12):1871–9.
100. Perrotti D, Neviani P. Protein phosphatase 2A: a target for anticancer therapy. *Lancet Oncol*. 2013 May;14(6):e229–238.
101. Cristóbal I, Garcia-Orti L, Cirauqui C, Alonso MM, Calasanz MJ, Odero MD. PP2A impaired activity is a common event in acute myeloid leukemia and its activation by forskolin has a potent anti-leukemic effect. *Leukemia*. 2011 Apr;25(4):606–14.
102. Schuback HL, Arceci RJ, Meshinchi S. Somatic characterization of pediatric acute myeloid leukemia using next-generation sequencing. *Semin Hematol*. 2013 Oct;50(4):325–32.
103. Link DC, Kunter G, Kasai Y, Zhao Y, Miner T, McLellan MD, et al. Distinct patterns of mutations occurring in de novo AML versus AML arising in the setting of severe congenital neutropenia. *Blood*. 2007 Sep 1;110(5):1648–55.
104. Maxson JE, Ries R, Wang Y-C, Gerbing RB, Kolb EA, Thompson SL, et al. CSF3R Mutations Represent a Novel Therapeutic Target in Pediatric AML with a High Degree of Overlap with CEBPA Mutations: a Report from COG AAML0531 and COG/NCI Target AML Initiative. *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):174–174.
105. Fasan A, Haferlach C, Perglerová K, Kern W, Haferlach T. CSF3R Mutations Are Predominantly Subclonal Events in Intermediate Risk Karyotype AML and Prevalently Occur with CEBPA Mutations. *Blood*. 2016 Dec 2;128(22):1658–1658.
106. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela J-M, Tigaud I, Botton S de, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2717–23.
107. Smith LT, Hohaus S, Gonzalez DA, Dziennis SE, Tenen DG. PU.1 (Spi-1) and C/EBP alpha regulate the granulocyte colony-stimulating factor receptor promoter in myeloid cells. *Blood*. 1996 Aug 15;88(4):1234–47.
108. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG.

Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):569–74.

109. Lavallée V-P, Krosł J, Lemieux S, Boucher G, Gendron P, Pabst C, et al. Chemo-genomic interrogation of CEBPA mutated AML reveals recurrent CSF3R mutations and subgroup sensitivity to JAK inhibitors. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):3054–61.

110. Maxson JE, Ries RE, Wang Y-C, Gerbing RB, Kolb EA, Thompson SL, et al. CSF3R mutations have a high degree of overlap with CEBPA mutations in pediatric AML. *Blood*. 2016 Jun 16;127(24):3094–8.

111. Jeha S, Chan KW, Aprikyan AG, Hoots WK, Culbert S, Zietz H, et al. Spontaneous remission of granulocyte colony-stimulating factor-associated leukemia in a child with severe congenital neutropenia. *Blood*. 2000 Nov 15;96(10):3647–9.

112. Kalra R, Dale D, Freedman M, Bonilla MA, Weinblatt M, Ganser A, et al. Monosomy 7 and activating RAS mutations accompany malignant transformation in patients with congenital neutropenia. *Blood*. 1995 Dec 15;86(12):4579–86.

113. Nösslinger T, Reisner R, Grüner H, Tüchler H, Nowotny H, Pittermann E, et al. Dysplastic versus proliferative CMML--a retrospective analysis of 91 patients from a single institution. *Leuk Res*. 2001 Sep;25(9):741–7.

114. Ricci C, Fermo E, Corti S, Molteni M, Faricciotti A, Cortelezzi A, et al. RAS mutations contribute to evolution of chronic myelomonocytic leukemia to the proliferative variant. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Apr 15;16(8):2246–56.

115. Cervera N, Itzykson R, Coppin E, Prebet T, Murati A, Legall S, et al. Gene mutations differently impact the prognosis of the myelodysplastic and myeloproliferative classes of chronic myelomonocytic leukemia. *Am J Hematol*. 2014 Jun;89(6):604–9.

116. Voglová J, Chrobák L, Neuwirtová R, Malasková V, Straka L. Myelodysplastic and myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukemia--distinct subgroups or two stages of the same disease? *Leuk Res*. 2001 Jun;25(6):493–9.

117. Selimoglu-Buet D, Wagner-Ballon O, Saada V, Bardet V, Itzykson R, Bencheikh L, et al. Characteristic repartition of monocyte subsets as a diagnostic signature of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2015 Jun 4;125(23):3618–26.

118. Braun T, Itzykson R, Renneville A, de Renzis B, Dreyfus F, Laribi K, et al. Molecular predictors of response to decitabine in advanced chronic myelomonocytic leukemia: a phase 2 trial. *Blood*. 2011 Oct 6;118(14):3824–31.

119. Figueroa ME, Skrabanek L, Li Y, Jiemjit A, Fandy TE, Paietta E, et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*. 2009 Oct 15;114(16):3448–58.

120. Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*. 2009 Feb 5;113(6):1315–25.
121. Meldi K, Qin T, Buchi F, Droin N, Sotzen J, Micol J-B, et al. Specific molecular signatures predict decitabine response in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2015 May 1;125(5):1857–72.
122. Droin N, Jacquel A, Hendra J-B, Racœur C, Truntzer C, Pecqueur D, et al. Alpha-defensins secreted by dysplastic granulocytes inhibit the differentiation of monocytes in chronic myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2010 Jan 7;115(1):78–88.
123. Kosmider O, Itzykson R, Chesnais V, Lasho T, Laborde R, Knudson R, et al. Mutation of the colony-stimulating factor-3 receptor gene is a rare event with poor prognosis in chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1946–9.
124. Ouyang Y, Qiao C, Chen Y, Zhang S-J. Clinical significance of CSF3R, SRSF2 and SETBP1 mutations in chronic neutrophilic leukemia and chronic myelomonocytic leukemia. *Oncotarget*. 2017 Feb 15;
125. Bilbao-Sieyro C, Santana G, Torres-Miñana L, Rodriguez-Medina C, Saez MN, Perera M, et al. Colony-stimulating factor-3 receptor, watch out for polymorphisms. *Leukemia*. 2015 Jun;29(6):1445–6.
126. Tran SD, Pillemer SR, Dutra A, Barrett AJ, Brownstein MJ, Key S, et al. Differentiation of human bone marrow-derived cells into buccal epithelial cells in vivo: a molecular analytical study. *Lancet*. 2003 Mar 29;361(9363):1084–8.
127. Li Y-T, Xie M-K, Wu J. DNA profiling in peripheral blood, buccal swabs, hair follicles and semen from a patient following allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Biomed Rep*. 2014 Nov;2(6):804–8.
128. Freedman MH, Alter BP. Risk of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in congenital neutropenias. *Semin Hematol*. 2002 Apr;39(2):128–33.

AUTEUR : BONNET Sarah

Date de Soutenance : 28 juin 2017

Titre de la Thèse : Les mutations de CSF3R dans les hémopathies myéloïdes

Thèse - Médecine - Lille 2017

Cadre de classement : *Hématologie clinique*

DES + spécialité : *Hématologie Maladies du Sang*

Mots-clés : Hémopathies myéloïdes, CSF3R, mutations juxta-membranaires, mutations du domaine extra-cellulaire, neutropénie congénitale sévère, leucémie chronique à neutrophiles, leucémie myéloïde chronique atypique, leucémie myélo-monocytaire chronique, leucémie aiguë myéloblastique, voies de signalisation.

Résumé :

Le récepteur au G-CSF (ou CSF3R) est le récepteur du G-CSF (ou CSF3), une cytokine qui contrôle la production, la différenciation et les fonctions des granulocytes. Des mutations somatiques du récepteur au G-CSF sont décrites dans un spectre large de pathologies myéloïdes, incluant des hémopathies malignes. Elles sont dans la plupart des cas activatrices et dans de rares cas, inhibitrices. Ces pathologies présentant des mutations de ce récepteur sont la neutropénie congénitale sévère (NCS), considérée comme un état pré-leucémique, les néoplasmes myéloprolifératifs tels que la leucémie chronique à neutrophiles (LCN), la leucémie myéloïde atypique (LMCa), la leucémie myélo-monocytaire chronique (LMMC) et plus rarement la leucémie aiguë myéloblastique (LAM). Le rôle oncogénique de CSF3R n'est pas parfaitement établi, il existe probablement des processus de coopération oncogénique comme en atteste l'association à d'autres mutations telles que celles de SETBP1, ETKN1 etc. La responsabilité du traitement par G-CSF dans la transformation leucémique reste une question d'actualité. Deux principales classes de mutations ont été mises en évidence : les mutations de CSF3R du domaine intra-cellulaire affectant l'extrémité C-terminale aboutissant à un récepteur tronqué entraînant une hypersensibilité au G-CSF et une activation de la voie des Src kinases, sensible à l'inhibition par le Dasatinib ; et des mutations du domaine juxta-membranaires entraînant une activation constitutive du récepteur en l'absence de son ligand avec pour conséquence l'activation permanente de la voie JAK-STAT, sensible à l'inhibition par le Ruxolitinib. Dans l'optique de rechercher une alternative thérapeutique pour ces pathologies, les travaux réalisés à l'Institut Gustave Roussy avaient pour objectif de déterminer si les mutations de CSF3R détectées dans la LMMC entraînaient une activation des voies de signalisation, auquel cas il aurait été intéressant de proposer des thérapies inhibitrices ciblées, comme en bénéficient par exemple les patients atteints de LMC (inhibiteur de tyrosine kinase). Nos résultats ne sont pas en faveur de mutations activatrices.

Un essai clinique de phase 2 est en cours pour les LCN et les LMCa.

Une meilleure connaissance de la physiopathologie de ces mutations est indispensable pour avancer dans l'arsenal thérapeutique de ces pathologies rares au pronostic sombre grevé par l'acutisation en leucémie aiguë.

Composition du Jury : Président : Pr F. MORSCHHAUSER

Directeurs : Pr E. SOLARY, Pr B. QUESNEL

Assesseurs : Dr M. WEMEAU, Dr A. MARCEAU

