

REMERCIEMENTS

A mon Jury,

Je tiens tout particulièrement à adresser mes premiers remerciements aux membres de mon jury de thèse qui ont accepté d'examiner mon manuscrit de thèse : le **Pr. Didier LUTOMSKI**, le **Dr. Marie-Caroline LE BOUSSE-KERDILÈS**, le **Dr. Valérie UGO** et le **Dr. Frédérique VERDIER**.

Voilà déjà trois ans de thèse qui s'achèvent, durant lesquelles il y a eu des moments intenses de joie et des moments plus difficiles. Cette thèse représente l'aboutissement d'un travail de longue haleine, un parcours jalonné d'étapes constructives mais aussi cadencé au rythme de montagnes russes. Une thèse qui a renforcé ma passion pour la recherche et qui m'a permis de me construire tant sur le plan scientifique que personnel.

A ma directrice de laboratoire,

Dr Nadine VARIN-BLANK,

Je tiens sincèrement à te remercier de m'avoir accueillie dans ton équipe. Durant toutes ces années, tu as toujours été disponible et avenante pour me faire grandir professionnellement et personnellement. Tu m'as soutenue grâce à tes paroles rassurantes, ton sourire et ta bienveillance.

A ma directrice de thèse,

Dr Laura Velazquez,

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de diriger ma thèse, sans toi, je n'en serais pas arrivée là aujourd'hui. Grâce à ta rigueur, tes conseils et les connaissances que tu m'as transmises, j'ai su et pu me développer scientifiquement. Notre travail d'équipe a fait de cette expérience, l'une des plus enrichissantes de mon parcours académique. Me poussant à aller au-delà de mes limites, toujours plus loin grâce à toi je suis une personne qui a évolué.

A mes sœurs et frère de cœur,

Les Batatas,

Lamia, il y a déjà trois ans de cela, je me suis installée dans ton bureau et je n'aurais pas pu mieux tomber. Nous nous sommes tout de suite liées d'amitié, sache que ta présence me

manque beaucoup, depuis ton départ.

Maïssa, depuis ton arrivée au laboratoire, tu nous as toutes réunies de par ta bonne humeur, ton sourire et ta joie de vivre. Drogée au café et moi au thé, nos pauses goûter me manquent déjà.

Nesha, on s'est connues il y a deux ans. Au début, tu ne pensais pas qu'on serait devenues amies toutes les deux et pourtant aujourd'hui tu fais partie de ma vie. Toujours prête à faire la fête, tes petites danses et ton énergie, permettent toujours de me remonter le moral.

Vanessa, ton originalité et ta personnalité m'ont toujours fait sourire. L'ambiance au labo n'est plus pareille depuis ton départ. Les fondatrices du groupe Batatas n'étaient plus réunies dans la vie du labo.

Vos visages souriants, votre tendresse et vos conseils m'ont accompagné au quotidien durant cette thèse. J'espère que cela continuera encore pendant de longues années. Vous avez toujours été présentes pour me soutenir, m'aider et partager mes moments de faiblesse comme de joie. Grâce à vous, ces trois années ont été une expérience exceptionnelle et inoubliable. Je vous remercie de tout mon cœur pour tous ces moments partagés. ***Batatas for life !!!***

Laurianne, ma sœur adoptive, voilà 15 ans qu'on s'est connues, à l'époque, nous étions qu'en 4^{ème}. Vêtues de nos joggings nous en avons parcouru des kilomètres. Nous nous sommes perdues de vue puis retrouvées mais notre amitié en reste inchangée.

Afla, mon grand frère, qui aurait cru que notre amitié durerait aussi longtemps. J'en ai aussi beaucoup parcouru des kilomètres avec toi. Voilà 13 ans que tu es entré dans ma vie et j'espère que ce chiffre continuera de grimper.

Pendant ces années, vous avez toujours été présents et vous avez toujours cru en moi, je vous remercie de cette belle amitié.

A l'équipe U978,

Je remercie tout d'abord les nouvelles recrues du groupe Batatas. **Anne, Myriam, Rim, Amel**, toujours prêtes à aider. Ainsi que **Laure**, avec qui j'ai partagé mon bureau, qui m'a écoutée et soutenue.

Je remercie également les autres étudiants, **Hugo** et **Souhail** qui sont arrivés au cours de ma thèse et qui ont participé à nos moments de joies et de fou rire. Je n'oublie pas les anciens étudiants avec qui j'ai passé de bons instants, je souhaite les remercier pour leur soutien, **Elodie, Hajer, Hanan, Maude, Stéphane** et notamment **Max** qui continue toujours à me taquiner malgré la distance. Comme quoi le proverbe, loin des yeux, loin du cœur, n'est pas toujours vrai.

Je remercie aussi tous les autres membres de l'unité **Bela, Christine, Denis, Laura G., Olivier, Stéphanie**, toujours prêts à aider les étudiants à se construire et se structurer dans leur

réflexion, mais également à partager des moments conviviaux.

A la Team P7,

Ah ces bonnes années de fac... elles sont lointaines mais nous, nous sommes toujours là, toujours soudés, la "bande de Paris 7", **Alexandra, David, Manoussa, Matthieu, Thomas et Quentin.**

Je vous remercie de m'avoir soutenue, aidée, conseillée et encouragée au cours de toutes ces années. Et merci, pour tous nos bons moments passés, présents et futurs.

A ma famille adorée,

A mes parents,

Les mots ne sont pas assez forts pour vous exprimer toute ma gratitude. Je vous suis inconditionnellement reconnaissante. Vous avez toujours fait le nécessaire pour faire de moi une battante, une femme généreuse et studieuse, malgré le fait que je resterai toujours votre bébé. Vous avez toujours fait le nécessaire pour faciliter mes études et effacer les petits tracas du quotidien. Je vous remercie de tout mon cœur, de m'avoir soutenue à votre manière pendant ces trois ans, et tout particulièrement pour cette fin de thèse. Et merci de répondre présents à chaque moment de ma vie, qu'ils soient joyeux ou tristes. Je ne sais comment vous exprimer ce que je ressens...

A mes sœurs,

Je remercie aussi mes sœurs et mes beaux-frères **Amanda, Navina, Navichka, Anand et Olivier** de m'avoir soutenue, aidée et appuyée pour mes études, malgré la distance et le manque de temps.

A mon Doudou,

Merci de tout mon cœur d'avoir été présent à mes côtés au quotidien pour partager les moments de joie, de doute et de chagrin. Tu n'as pas hésité à sauter dans ta voiture pour voler à mon secours et m'aider à traverser les périodes difficiles, tel un prince charmant... Tu m'as poussé à donner le meilleur de ma personne et à ne rien abandonner. Merci pour le temps que tu as consacré à me soutenir moralement et pour la réalisation de tous mes petits caprices.

Merci infiniment à tous de votre aide, vos encouragements et votre soutien, merci à ceux que j'aurai pu oublier de citer.

Avec toute ma gratitude et mon amitié sincère.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements.....	2
Table des matières	5
Table des figures	8
Index des tableaux.....	9
Abréviations.....	10
Avant-propos	15
Introduction.....	17
Chapitre I : Le système hématopoïétique	18
I. Origine et développement des cellules hématopoïétiques	19
II. Régulation de l'hématopoïèse par les principales cytokines du système	22
Chapitre II : Les voies de signalisation des cytokines impliquées dans l'hématopoïèse	25
I. Les voies de signalisation des récepteurs aux cytokines.....	26
A. Les récepteurs aux cytokines	26
B. Les protéines de signalisation à domaines fonctionnels non-catalytiques	29
C. La voie de signalisation JAK/STAT.....	32
1. Les tyrosine kinases de la famille JAK.....	32
2. Les facteurs de transcription STAT.....	33
3. Activation de la voie JAK/STAT	35
4. Rôle fonctionnel de la voie JAK/STAT.....	38
D. La voie de signalisation des kinases de la famille Src	41
E. La voie de signalisation impliquant Ras/MAPK	41
F. La voie de signalisation impliquant PI3K/AKT	42
II. Régulation négative des voies de signalisation des récepteurs aux cytokines	44
A. Régulation via des protéines avec activité catalytique	46
1. Les phosphatases de la famille SHP	46
2. Les protéines de la famille E3 ligase Cbl.....	46
B. Régulation via les protéines adaptatrices inhibitrices	49
1. Les protéines de la famille SOCS	49
2. Les protéines de la famille LNK	50
Chapitre III : Les protéines adaptatrices de la famille LNK	52
I. Origine et expression cellulaire	53
II. Structure des protéines de la famille LNK.....	56
A. La région N-terminale.....	56
B. Le domaine PH	60
C. Le domaine SH2.....	60
D. Les résidus tyrosine et sérine.....	61
III. Rôle fonctionnel des protéines de la famille LNK.....	62
A. Rôle dans le système hématopoïétique.....	65
1. Régulation des voies de signalisation induites par les récepteurs aux cytokines	65

a.	La voie de signalisation TPO/MPL.....	65
b.	La voie de signalisation EPO/EPOR.....	68
c.	La voie de signalisation IL-7/IL-7R.....	71
2.	Régulation des voies de signalisation induites par les RTK.....	73
3.	La voie de signalisation des intégrines.....	77
4.	Les voies de signalisation des récepteurs à l'antigène (BCR et TCR).....	79
B.	Rôle dans le système vasculaire.....	83
C.	Dans le système nerveux.....	85
D.	Rôle dans d'autres systèmes cellulaires.....	85
1.	Les voies de signalisation de l'insuline et de la leptine.....	85
2.	Les voies de signalisation de l'hormone de croissance.....	86
IV.	Mécanisme d'action des adaptateurs de la famille LNK : le modèle SH2-B/JAK2	89
	Chapitre IV : Rôle de LNK dans les pathologies Humaines	91
I.	Les Néoplasmes Myéloprolifératifs.....	92
A.	Caractéristiques cliniques.....	92
B.	Caractéristiques moléculaires.....	95
1.	Les principales mutations déterminantes menant au phénotype NMP.....	97
a.	Les mutations de JAK2.....	97
b.	Les mutations du MPL.....	103
c.	Les mutations de la calreticuline.....	103
2.	Autres mutations identifiées dans les NMP.....	106
3.	Autres facteurs impliqués dans le développement des NMP.....	106
C.	Mutations et implications de l'adaptateur LNK dans les NMP.....	107
II.	Leucémie Lymphoblastique Aiguë de précurseurs B.....	113
III.	Oncogenèse.....	114
IV.	Maladies inflammatoires et vasculaires.....	115
	Chapitre V : Approches thérapeutiques	116
I.	Thérapies utilisées dans les NMP Ph.....	117
II.	Thérapies envisageables par des peptides pénétrants.....	120
A.	Les différents types de CPP.....	120
B.	Entrée des CPP dans la cellule.....	125
C.	Expériences <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	130
	Objectifs de la thèse.....	131
	Résultats.....	133
I.	Article : Les mutations de LNK retrouvées dans les Néoplasmes Myéloprolifératifs mettent en évidence une nouvelle région régulatrice de l'adaptateur sur la signalisation dépendante de JAK2.....	134
II.	Résultats complémentaires : Utilisation de LNK comme outil thérapeutique ...	178
A.	Stratégies expérimentales.....	179
1.	Constructions utilisées.....	179
2.	Production des protéines.....	179
3.	Méthodes expérimentales.....	182
a.	Western blot et Immunoprécipitation.....	182
b.	Transduction et visualisation des protéines des CPP.....	182
B.	Résultats préliminaires.....	184
1.	Production des protéines recombinantes.....	184
2.	Interaction entre JAK2 et les protéines recombinantes.....	186
3.	Internalisation des protéines recombinantes.....	187
C.	Conclusion et perspectives.....	187

Discussion.....	189
I. Caractérisation structurale et fonctionnelle de LNK dans des contextes physiologiques et pathologiques.....	191
A. Caractérisation structurale de l'interaction LNK/JAK2	191
B. Implication fonctionnelle de l'interaction LNK/JAK2	194
C. Rôle des mutations de LNK sur sa fonction régulatrice.....	195
D. Modèle d'inhibition de LNK.....	196
1. Modèle d'action de LNK -WT	196
2. Modèle d'action des mutations de LNK.....	199
II. Utilisation de LNK comme outil thérapeutique	202
III. Perspectives	205
Références Bibliographiques.....	207

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse définitive chez l'homme.....	21
Figure 2 : Régulation de l'hématopoïèse définitive par les cytokines chez l'homme.....	24
Figure 3 : Schéma des récepteurs aux cytokines de Type I.....	28
Figure 4 : Exemple de protéines contenant des domaines fonctionnels sans activité catalytique.....	31
Figure 5 : Structure schématique de JAK2 et des facteurs STAT.....	34
Figure 6 : Modèle d'activation de JAK2.....	36
Figure 7 : Modèle d'activation de la voie de signalisation JAK/STAT.....	37
Figure 8 : Les principales voies de signalisation induites par cytokines.....	43
Figure 9 : Représentation schématique des structures des protéines SHP, Cbl et SOCS.....	45
Figure 10 : Mécanisme d'ubiquitination des protéines Cbl.....	48
Figure 11 : Modèle d'action des protéines adaptatrices.....	51
Figure 12 : Représentation schématique des protéines de la famille LNK.....	58
Figure 13 : Représentation schématique de la région N-terminale des protéines de la famille LNK et alignement des séquences du domaine de dimérisation.....	59
Figure 14 : Rôle de LNK dans la voie de signalisation TPO/MPL.....	67
Figure 15 : Rôle des protéines adaptatrices de la famille LNK sur la voie de signalisation EPO/EPOR.....	70
Figure 16 : Rôle de LNK dans la voie de signalisation IL-7/IL-7R.....	72
Figure 17 : Rôle de LNK dans la voie de signalisation SCF/Kit.....	76
Figure 18 : Modèle d'action de LNK via les intégrines.....	78
Figure 19 : Modèle d'action de LNK via les intégrines dans les cellules endothéliales.....	84
Figure 20 : Mécanisme d'action de SH2-B sur JAK2 stimulé par la GH : rôle d'activateur.....	90
Figure 21 : Mécanisme d'action de SH2-B sur JAK2 stimulé par la leptine.....	90
Figure 22 : Caractéristiques cliniques et évolution des NMP (Ph-).....	94
Figure 23 : Modèle d'activation de JAK2-V617F.....	100
Figure 24 : Modèle de souris pour l'étude de JAK2-V617F.....	102
Figure 25 : Représentation schématique des mutations du récepteur MPL.....	105
Figure 26 : Représentation schématique des mutations de la calréticuline.....	105
Figure 27 : Localisation des mutations identifiées dans les NMP Ph- et LMA de la protéine LNK.....	110
Figure 28 : Mutations de LNK dans les LLA-B.....	113
Figure 29 : Les différents inhibiteurs utilisés dans le traitement des NMP.....	119
Figure 30 : Liaison des CPP aux cargos.....	124
Figure 31 : Voies d'endocytose des CPP.....	127
Figure 32 : Modèle de translocation du peptide TAT.....	128
Figure 33 : Translocation directe de la membrane par les CPP.....	129
Figure 34 : Représentation schématique des plasmides utilisés et des protéines obtenues.....	181
Figure 35 : Protocole d'internalisation des CPP.....	183
Figure 36 : His-SH2 et TAT-SH2, vérification de la production et de l'élution.....	185
Figure 37 : Schéma explicatif de l'immunoprécipitation entre JAK2 et les protéines recombinantes LNK.....	186
Figure 38 : Internalisation du peptide Atto488-BSA avec le cocktail de CPP.....	188
Figure 39 : Domaines de LNK et JAK2 impliqués dans leur interaction.....	193
Figure 40 : Modèle d'inhibition de LNK WT dans la voie TPO.....	198
Figure 41 : Modèle d'action de LNK-E208Q.....	200
Figure 42 : Modèle d'action de LNK-G152R.....	201
Figure 43 : Modèle d'action d'un CPP-LNK-NPH.....	204

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Les kinases JAK et les facteurs de transcription STAT impliqués dans la signalisation induite par les récepteurs aux cytokines (Type I).....</i>	<i>39</i>
<i>Tableau 2 : Phénotype des souris KO pour les protéines JAK et STAT.....</i>	<i>40</i>
<i>Tableau 3: Expression cellulaire et tissulaire des protéines de la famille LNK.....</i>	<i>55</i>
<i>Tableau 4 : Phénotype des souris déficientes en SH2-B, APS et LNK.....</i>	<i>64</i>
<i>Tableau 5 : Rôle des protéines de la famille LNK dans le système hématopoïétique.....</i>	<i>81</i>
<i>Tableau 6 : Rôle des protéines adaptatrices de la famille LNK dans d'autres systèmes cellulaires.....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau 7 : Fréquences des mutations retrouvées dans les NMP Ph.....</i>	<i>96</i>
<i>Tableau 8 : Mutations de LNK identifiées dans les NMP Ph et LMA.....</i>	<i>111</i>
<i>Tableau 9 : Classement des CPP les plus utilisés selon leurs origines.....</i>	<i>122</i>
<i>Tableau 10 : Classement des CPP les plus utilisés selon leurs propriétés physico-chimiques.....</i>	<i>123</i>

ABRÉVIATIONS

A	Alanine
ABL	Abelson
ADN	Acide desoxyribonucléique
APS	Adaptor protein with PH and SH2 domain
ARN	Acide ribonucléique
ASXL1	« Additional sex combs like 1 »
ATP	Adénosine triphosphate
BCR	(Chap IV) « Breakpoint Cluster Region »
BCR	Récepteur à l'antigène des cellules B
BFU-E	Erythroid burst-forming units
BSA	Bovine Serum Albumine
c-Fms	Récepteur au M-CSF
C-ter	Extrémité carboxy-terminale
CALR	Calréticuline
CAP	« Cbl-associated protein »
CBL	Casitas B-lineage Lymphoma
CFU-E	Erythroid colony-forming units
CIS	« Cytokine-induced SH2- domain containing »
CLP	Progéniteur lymphoïde commun
CML	Leucémie myéloïde chronique
CMP	Progéniteur myéloïde commun
CNTF	« Ciliary Neurotrophic Factor »
COMFORT	« CONtrolled MyeloFibrosis study with Oral JAK inhibitor Treatment »
CPP	Peptides pénétrants les cellules
CSF	Facteur de croissance
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DC	Cellule dendritique
DD	Domaine de dimérisation
Del	Délétion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNMT3A	DNA méthyltransférase 3A
E	Acide glutamique
EC	Cellules endothéliales
EPO	Erythropoïétine
ERK	« Extracellular signal-Related Kinase »
FDA	« US Food and Drug Administration »
FERM	« Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moezin »
FL	Ligand du FLT3
FLT 3	« Fms-Like Tyrosine kinase 3 »
Fs	Frameshift/décalage du cadre de lecture
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GEF	Facteur d'Echange de Guanine/ Guanine Exchange Factor
GH	Hormone de croissance
GIV	G α -interacting vesicle associated protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor
GMP	Progéniteur monocyte-granulocytaire
Grb2	Growth factor receptor bound protein
GSK3	Glycogen synthase kinase
GWAS	Genome-Wide Association Studies
His	Etiquettes histidine
HIV-1	Virus d'immunodéficience humaine-1
HP1 α	Protéine répresseur de l'hétérochromatine 1 α
HSC	Cellule souche hématopoïétique
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IGF-1	Insulin Growth Factor-1
IKZF1	IKAROS zinc finger protein 1
IL	interleukine
ILK	Kinase associée aux intégrines
iNK	Immature Natural killer
Ins	Insertion
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IR	Récepteur à l'insuline

IRS	Insulin Receptor Substrat
JAK	Kinases Janus
JH	Région d'homologie à JAK
JM	Juxtamembranaire
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
K	Lysine
KI	Insertion Kinase
KIR	Kinase Inhibitory Region
KIT	Récepteur au SCF
L	Leucine
LB	Lysogeny Broth
LIF	Leukemia Inhibitory factor
LLA-B	Leucémie lymphoblastique aiguë des précurseurs B
LMA	Leucémie myéloïde aiguë
LNK-EQ	LNK-E208Q
LNK-GR	LNK-G152R
LPR	Récepteur à la leptine
LT-HSC	Cellule souche hématopoïétique à long terme
LZ	Leucin zipper
M-CSF	Macrophage- colony stimulating factor
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDP	Progéniteur macrophage-dendritique
MEK	MAP (ERK) kinase
MEP	Progéniteur mégacaryocyte-érythrocytaire
MFP	Myélofibrose primitive
MPL	Myeloproliferative Leukemia virus proto-oncogene
MPP	Progéniteur multipotent
NES	Séquence d'export nucléaire
NF1	Neurofibromatosis 1
NGF	Nerve Growth Factor
NK	Natural killer
NLS	Séquence de localisation nucléaire
NMP	Néoplasmes myéloprolifératifs
NPH	Région N-terminale incluant le domaine PH de LNK

NRAS	Neuroblasma RAS
Nter	Extrémité amino - terminale
OMS	Organisation mondiale de la santé
OSMR	Récepteur à l'oncostatine M
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	Platelets-derived growth factor
Ph	Chromosome Philadelphie
PH	Domaine d'homologie à la Pleckstrine
Ph-	Négatif pour le chromosome Philadelphie
Ph-	Négatif pour le chromosome Philadelphie
PI3K	Phospho-Inositide-3 Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4-5 biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3-4-5 triphosphate
PKA	Protéine Kinase A
PolyR	Poly Arginine
Pré-B	Précurseur unipotent de lymphocyte B
Pré-T	Précurseur unipotent de lymphocyte T
PRLR	Récepteur à la prolactine
PRMT5	Arginine méthyltransférase
PSM	Proline-rich; PH and SH2 domain-containing signaling Mediator
PTB	Phosphotyrosine-binding domain
PTP	Famille de protéines PhosphoTyrosine Phosphatase
PTP	Domaine catalytique phosphatase
PV	Polycythémie vraie
Q	Glutamine
R	Arginine
R	Récepteur
RING	Really Interesting New Gene
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
S	Sérine
SCF	Stem Cell Factor
SH2	Domaine d'homologie à Src 2

SH2-B	Src homology 2-B
SH2-L	Domaine similaire au domaine d'homologie à Src 2
SH3	Domaine d'homologie à Src 3
SHC	Src homology and collagen homology
SHP	SH2-containing phosphatases
SNP	Polymorphisme
SOCS	Suppressor Of Cytokines Signaling
SOS-1	Son of sevenless-1
ST-HSC	Cellule souche hématopoïétique à court terme
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thréonine
TAD	Domaine d'activation transcriptionnelle
TAT	Trans-Activator of Transcription
TCR	Récepteur à l'antigène des cellules T
TE	Thrombocytémie essentielle
TET2	Ten eleven translocation member 2
TI-2	Antigène thymus-indépendant du type 2
TKB	Tyrosine Kinase Binding
TNF	Tumor Necrosis Factor
TPO	Thrombopoïétine
TYK2	Tyrosine kinase 2
UBA	Ubiquitin associated
V	Valine
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molécule-1
W	Tryptophane
WT	Phénotype sauvage
X	(Chap II) résidu quelconque
X	(Chap IV) codon stop
Y	Tyrosine

AVANT-PROPOS

Mon projet de thèse a consisté en l'étude de la protéine adaptatrice LNK dans le système hématopoïétique, dans des contextes physiologique et pathologiques, afin d'envisager son utilisation comme outil thérapeutique pour certaines maladies hématopoïétiques. Ce projet s'est déroulé au sein du laboratoire INSERM U978 « Adaptateur de signalisation en hématologie » (ASIH) à l'Université Paris 13 de Bobigny, dans le département « Santé, Médecine et Biologie Humaine » (SMBH).

L'homéostasie du système hématopoïétique nécessite une régulation très précise pour assurer une production contrôlée des différents lignages hématopoïétiques. Dans un contexte physiologique, l'adaptateur LNK régule négativement le développement des cellules hématopoïétiques, telles que les mégacaryocytes, érythrocytes et progéniteurs B. Sa fonction dans le développement lymphoïde et myéloïde a été mise en évidence par l'invalidation de son gène chez la souris. En effet, ces souris *Lnk*^{-/-} présentent une splénomégalie associée à une fibrose ainsi qu'une augmentation importante du nombre de cellules souches hématopoïétiques, de progéniteurs lymphoïdes B et myéloïdes (érythrocytaires et mégacaryocytaires). De plus, ces cellules montrent également une hypersensibilité à plusieurs cytokines dont la thrombopoïétine et l'érythropoïétine. Ceci induit une stimulation anormale des voies de signalisation activées par ces cytokines, notamment les voies JAK/STAT et MAPK. Par ailleurs, le phénotype de ces souris *Lnk*^{-/-} ressemble aux caractéristiques cliniques observées chez les patients atteints de Néoplasmes Myéloprolifératifs (NMP), suggérant l'implication de LNK dans le développement de ces pathologies. Ceci a finalement été confirmée par la découverte de mutations et de polymorphismes du gène *LNK* dans les NMP et également dans les Leucémies Lymphoblastiques Aiguës de précurseurs de cellules B. Toutefois, le mécanisme par lequel LNK régule l'activation de ses partenaires, dont la tyrosine kinase JAK2, et les effets des mutations sur son gène dans le développement de ces hémopathies, n'est pas clairement défini à ce jour.

Nos précédents travaux sur la caractérisation moléculaire du complexe LNK/JAK2, ont identifié deux sites de liaison entre JAK2 et LNK. En effet, LNK se lie à JAK2 principalement par son domaine SH2, et par un nouveau site de liaison, sa région N-terminale. L'association de ces deux protéines par ce dernier site se fait de manière plus importante avec la forme mutée de la kinase retrouvée chez les patients atteints de NMP, JAK2-V617F, qu'avec la forme sauvage, JAK2-WT.

Ainsi, au cours de ma thèse, j'ai mené des analyses structurales et fonctionnelles sur le site de liaison à partir de la région N-terminale de LNK afin de définir son rôle dans la régulation du complexe LNK/JAK2.

Mes travaux ont montré, pour la première fois, la fonction inhibitrice de la région N-terminale de LNK sur l'activation de JAK2. De ce fait, l'objectif final de ma thèse fut de

développer une stratégie, en utilisant des peptides pénétrants, où la région N-terminale de LNK serait un inhibiteur spécifique de la forme mutée JAK2-V617F, chez les patients atteints de NMP.

Ce manuscrit vous dévoilera mes années d'études sur ce projet. Il débute par une brève description de l'hématopoïèse et sa régulation, plus particulièrement par des protéines régulatrices. J'ai poursuivi par la description du rôle des adaptateurs la famille LNK dans le système hématopoïétique, ainsi que dans d'autres systèmes. Ensuite, puisque LNK est fortement impliquée dans le développement de plusieurs pathologies humaines, les principales caractéristiques cliniques et moléculaires des maladies dans lesquelles son rôle s'est avéré clé, ont été décrites. Enfin, la dernière partie décrit les approches thérapeutiques utilisées pour le traitement de ces hémopathies et l'enjeu des peptides pénétrants dans le développement d'un traitement. Mes résultats sont ensuite présentés sous forme d'un article à soumettre prochainement et de résultats supplémentaires, et sont suivis d'une discussion générale sur le mécanisme par lequel LNK régule l'activité JAK2 dans des contextes physiologique et pathologique.

INTRODUCTION

CHAPITRE I :

**LE SYSTÈME
HÉMATOPOÏÉTIQUE**

I. Origine et développement des cellules hématopoïétiques

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production de cellules sanguines. Elle débute par l'établissement d'un microenvironnement spécifique favorisant l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches, progéniteurs et précurseurs hématopoïétiques en passant par des mécanismes moléculaires induisant la prolifération et/ou la survie des cellules hématopoïétiques matures.

Chez les mammifères, l'initiation de l'hématopoïèse précoce est extra-embryonnaire et débute par la migration de cellules mésodermiques dans le sac vitellin. Les cellules produites à cette étape donnent naissance à des progéniteurs bipotents qui se différencient en érythrocytes primitifs nucléés et en cellules endothéliales formant des vaisseaux primitifs. L'hématopoïèse précoce se poursuit ensuite dans l'embryon en migrant dans l'aorte dorsale, plus exactement dans la région Aorte-Gonades-Mesonephros où a lieu la formation de cellules qui induiront l'hématopoïèse définitive. Ces cellules coloniseront le foie fœtal, ce qui favorisera la maturation et l'expansion des cellules avant l'établissement de l'hématopoïèse définitive dans la moelle osseuse (Huang et al., 2007).

L'hématopoïèse définitive, après la naissance, est initiée par des cellules souches hématopoïétiques (HSC) de la moelle osseuse (Figure 1). Elles sont indifférenciées et caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement, de quiescence et de différenciation en tous types de cellules hématopoïétiques, ce sont des cellules multipotentes (Huang et al., 2007). Toutefois, leur capacité d'auto-renouvellement s'amointrit au cours de leur différenciation. À l'origine de l'hématopoïèse, se trouvent des HSC à long-terme (LT-HSC) ayant une capacité d'auto-renouvellement illimitée et la plus forte activité multipotente. Ces cellules restent quiescentes jusqu'à leur activation par des stimuli environnementaux lors d'une régénération physiologique d'un tissu, de la compensation d'une perte de sang ou suite à un processus pathologique. Après activation, elles entament leur auto-renouvellement et leur différenciation en réalisant une division cellulaire symétrique ou asymétrique. Lors d'une division symétrique, les deux cellules filles sont identiques à la cellule mère, contrairement à la division asymétrique où seule l'une des cellules filles sera identique à la cellule mère, participant au maintien du système hématopoïétique, et l'autre cellule fille débutera sa différenciation en cellule sanguine. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la différenciation cellulaire des HSC. La première, propose une distribution inégale des déterminants cytoplasmiques, et la deuxième, propose que des signaux extrinsèques du microenvironnement local induisent différentes destinées pour les deux cellules filles identiques. Ainsi, la division cellulaire des LT-HSC induit la production de cellules filles dites HSC à court-terme (ST-HSC). Ces cellules multipotentes sont maintenant engagées dans la différenciation et ont une capacité d'auto-renouvellement courte, de l'ordre de quelques semaines. Les ST-HSC se divisent, à leur tour, pour se différencier en cellules appelées progéniteurs multipotents (MPP). Sous l'influence de différents facteurs, les MPP se divisent, perdent leur potentiel d'auto-renouvellement et deviennent des

progéniteurs oligopotents, capables de se différencier et de s'engager en différents lignages hématopoïétiques (Huang et al., 2007).

Ainsi, les MPP donnent naissance à deux types de progéniteurs oligopotents, les progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) (Kondo et al., 1997) et les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) (Akashi et al., 2000). Identifiés par ces équipes chez la souris, ces progéniteurs ont une capacité de prolifération diminuée, compensée par une capacité de différenciation augmentée.

Les CLP sont les premières cellules engagées dans le lignage lymphoïde (Kondo et al., 1997). Selon les signaux reçus par ces progéniteurs, leur division forme les précurseurs unipotents des lymphocytes B (pré-B), des lymphocytes T (pré-T) et des cellules « Natural Killer » (iNK, immature NK) qui se différencieront en lymphocyte B, T et en cellules NK.

Quant aux CMP, ils génèrent des progéniteurs monocyte-granulocytaire (GMP) et des progéniteurs mégacaryocyte-érythrocytaires (MEP). La division cellulaire des GMP donne naissance aux progéniteurs macrophage-dendritique oligopotents (MDP) et aux précurseurs des cellules granulocytaires (Akashi et al., 2000). Les MDP vont, par la suite, former les précurseurs monocytaires et dendritiques qui se différencieront respectivement en macrophages et cellules dendritiques. Cependant, il a été montré que les cellules dendritiques (DC) peuvent aussi avoir une origine lymphoïde (Iwasaki and Akashi, 2007). Quant aux précurseurs granulocytaires, ils se différencient en mastocytes, neutrophiles, éosinophiles et basophiles. En ce qui concerne les MEP, leur division formera les précurseurs mégacaryocytaires et les précurseurs érythrocytaires (réticulocytes) qui se différencieront respectivement en plaquettes et en érythrocytes (Fiedler.K, 2012).

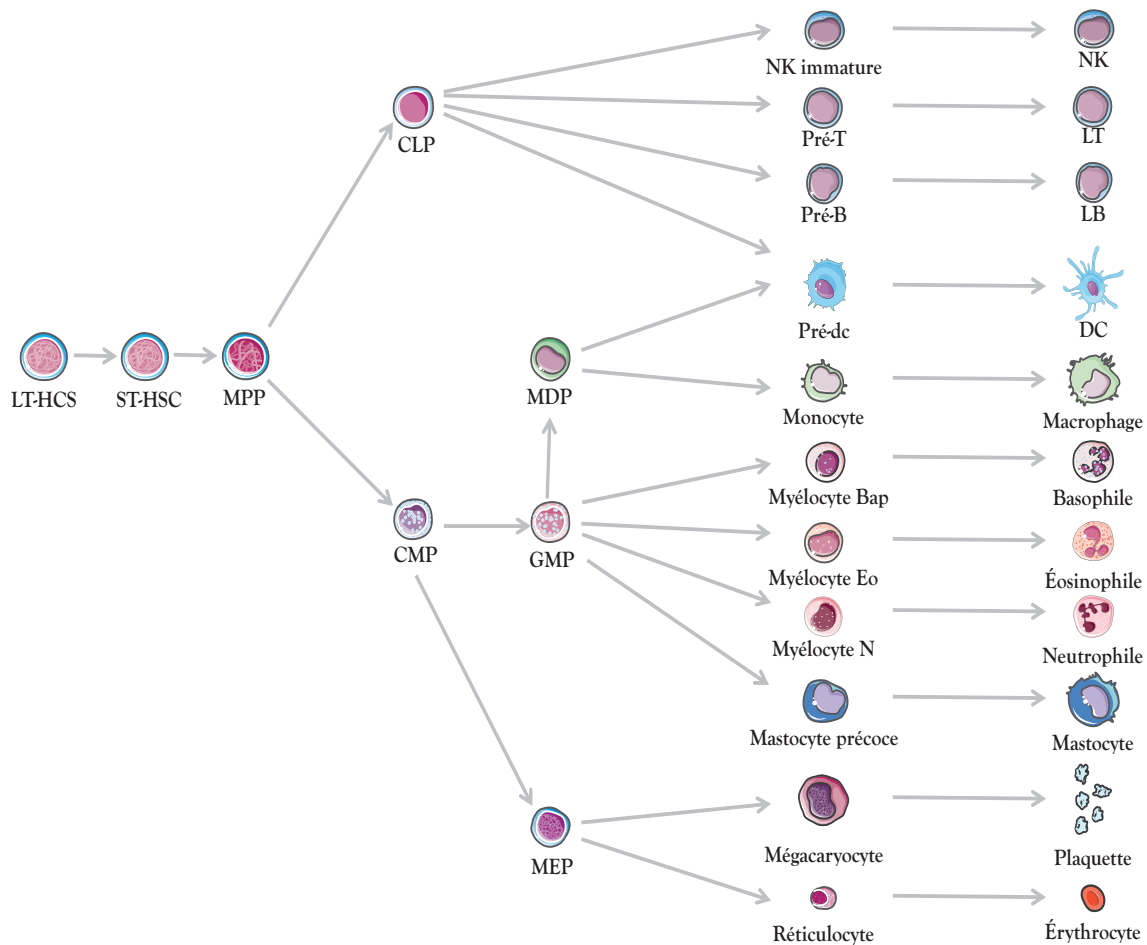


Figure 1 : Schéma de l'hématopoïèse définitive chez l'homme

Les cellules souches hématopoïétiques à long-terme (LT-HSC) se divisent en cellules souches hématopoïétiques à court-terme (SH-HSC) qui forment des progéniteurs multipotents (MPP). Par la suite, les MPP donnent des progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) qui se différencient en précurseurs lymphocytes B (pré-B), T (pré-T) et en « Natural killer » (NK) immatures. D'autre part, les MPP se différencient en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) afin de produire des progéniteurs mégacaryocyte-érythrocytaires (MEP) et des progéniteurs monocyte-granulocytaires (GMP). Les MEP se différencient d'une part en mégacaryocytes puis plaquettes et d'autre part en réticulocytes puis érythrocytes. Les GMP se différencient en mastocytes, en myélocytes neutrophiles (N), éosinophiles (Eo) et basophiles (BaP) et en progéniteurs macrophage-dendritique (MDP). Les MDP se différencient en précurseurs dendritiques (pré-DC) et monocyte qui formeront des cellules dendritiques et des macrophages. D'après la banque d'images Servier Medical Art et le livre « Hematopoiesis - Science and Practice », chapitre « Mechanisms controlling hematopoiesis » (Fiedler.K, 2012)

II. Régulation de l'hématopoïèse par les principales cytokines du système

La durée de vie des cellules sanguines étant de quelques heures à quelques semaines, l'hématopoïèse, dite basale ou normale, a lieu tout au long de la vie de l'organisme afin de maintenir un nombre constant de cellules pour chaque lignée. Lorsque l'hématopoïèse est déclenchée par une blessure ou une maladie, elle est appelée hématopoïèse d'urgence. Ces deux types d'hématopoïèse sont régulés par différents mécanismes moléculaires stimulés par des facteurs hématopoïétiques humoraux tels que des cytokines contrôlant des réponses biologiques importantes.

Le terme cytokine inclut des molécules telles que les interleukines (IL), les facteurs de croissance (CSF : Colony-Stimulating Factor), les chimiokines, les hormones polypeptidiques et d'autres facteurs. Elles peuvent agir de manière autocrine, paracrine ou endocrine et possèdent plusieurs propriétés. En effet, elles ont la capacité d'agir en synergie avec d'autres cytokines, ce qui est nécessaire au développement des cellules hématopoïétiques. Elles sont pléiotropes, c'est-à-dire qu'une même cytokine peut avoir plusieurs actions sur différentes cellules cibles. Enfin, différentes cytokines peuvent exercer un même effet sur le même type cellulaire, c'est la capacité de redondance.

Les cytokines sont divisées en plusieurs catégories selon leur rôle dans l'hématopoïèse normale (CSF) ou dans l'hématopoïèse d'urgence suite à une infection (les interférons : IFN), une blessure ou une transplantation (IL, les facteurs de nécrose (TNF : Tumor Necrosis Factor) (Metcalf, 2008). Elles peuvent également être classées selon leur lignage cible. Certaines cytokines ne sont pas spécifiques d'une lignée donnée et agissent au niveau des étapes précoces de l'hématopoïèse (Figure 2).

Le "Stem Cell Factor" (SCF), la thrombopoïétine (TPO), le ligand au récepteur "Fms-Like Tyrosine kinase 3" (FLT3), l'IL-3 et l'IL-6 agissent en synergie afin de réguler l'auto-renouvellement, la quiescence, la survie, la prolifération et la différenciation des HSC. Ceci est possible grâce à l'expression des récepteurs de ces cytokines sur les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, le récepteur « Myeloproliferative Leukemia virus proto-oncogene » (MPL) de la TPO, le récepteur FLT3, le récepteur Kit pour le SCF et les récepteurs aux interleukines 3 et 6.

En plus de sa forme soluble, le SCF existe sous forme membranaire. Cette forme du SCF agit comme une molécule d'adhésion, permettant de maintenir les HSC dans la moelle osseuse. Cette cytokine joue principalement un rôle dans la motilité, l'auto-renouvellement et la survie des HSC (Kent et al., 2008). Le SCF agit en synergie avec d'autres cytokines, citées dans ce chapitre, pour stimuler l'expansion des cellules. Quant à la TPO, elle permet de maintenir la quiescence des HSC, toutefois, elle stimule aussi l'expansion de ces cellules en cas d'hématopoïèse d'urgence, suite, par exemple, à une transplantation. Ceci suggère qu'elle joue

un rôle sur le cycle cellulaire, probablement dû au microenvironnement des cellules (Bersenev et al., 2008 ; de Graaf and Metcalf, 2011). Le ligand du FLT3 (FL), outre son rôle sur les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques, régule le développement des cellules dendritiques. De plus, il a été montré chez la souris que les progéniteurs multipotents exprimant FLT3 ne se différencient qu'en cellules lymphoïdes et que les souris sauvages ayant reçues une injection de FL ont un nombre de progéniteurs mégacaryocyte-érythrocytaires diminué. La cytokine FL agit en synergie avec l'IL-7 afin de stimuler le développement lymphoïde.

L'IL-6, en plus de son action sur les HSC, participe au développement des cellules T et à la différenciation des cellules T cytotoxiques, des macrophages et des mégacaryocytes. Quant à l'IL-3, elle agit aux étapes précoces de l'hématopoïèse. Elle fait partie des cytokines appelées CSF, regroupant aussi le "granulocyte-macrophage-colony stimulating factor" (GM-CSF), le "granulocyte-colony stimulating factor" (G-CSF) et le "macrophage-colony stimulating factor" (M-CSF). Le GM-CSF a, en particulier, un effet pléiotropique sur les cellules hématopoïétiques puisqu'il agit comme un facteur de croissance des MEP en synergie avec d'autres cytokines et des progéniteurs granulocytaires pour la maturation et prolifération des neutrophiles, éosinophiles et des macrophages (Brown et al., 2015 ; Iwasaki and Akashi, 2007).

D'autres cytokines ont une fonction restreinte à un lignage spécifique donné et sont nécessaires à l'acquisition de caractères de maturation spécifique (Figure 2). L'interleukine 7 est un facteur déterminant pour les progéniteurs lymphoïdes B et T chez la souris et pour la lignée T chez l'homme (Blom and Spits, 2006). La différenciation des CLP se fait, en partie, grâce à l'IL-7 qui agit en synergie avec d'autres cytokines, telles que l'IL-15 nécessaire à la production des NK et l'IL-2 pour les lymphocytes T. En ce qui concerne la lymphopoïèse B chez l'homme, elle est principalement co-stimulée par l'IL-6 et l'IL-4 pour stimuler la différenciation des progéniteurs B (Metcalf, 2008). Différentes cytokines peuvent également agir sur les CMP afin qu'ils se différencient en GMP. Sous l'influence du G-CSF et de l'IL-5, ces progéniteurs se différencient en éosinophiles, basophiles et neutrophiles. L'IL-3 en synergie avec le SCF stimule la différenciation des GMP en mastocytes (Okayama and Kawakami, 2006), et le M-CSF entraîne leur différenciation en macrophages (Metcalf and Burgess, 1982). D'autre part, l'érythropoïétine (EPO) étant responsable de la survie, de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs érythroïdes, est cruciale pour la lignée érythrocytaire (Wu et al., 1995). Quant à la TPO, elle agit en synergie avec l'IL-3 et le SCF afin de stimuler la différenciation des CMP en MEP (Metcalf, 2008). En effet, la TPO permet de stimuler la mitose des progéniteurs mégacaryocytaires tardifs et la maturation des mégacaryocytes. De ce fait, elle joue un rôle important et majeur dans la mégacaryopoïèse et par conséquent, dans la production des plaquettes, appelée thrombopoïèse. Cependant, il semble qu'elle n'a aucun effet sur la libération des plaquettes (Kuter, 2013).

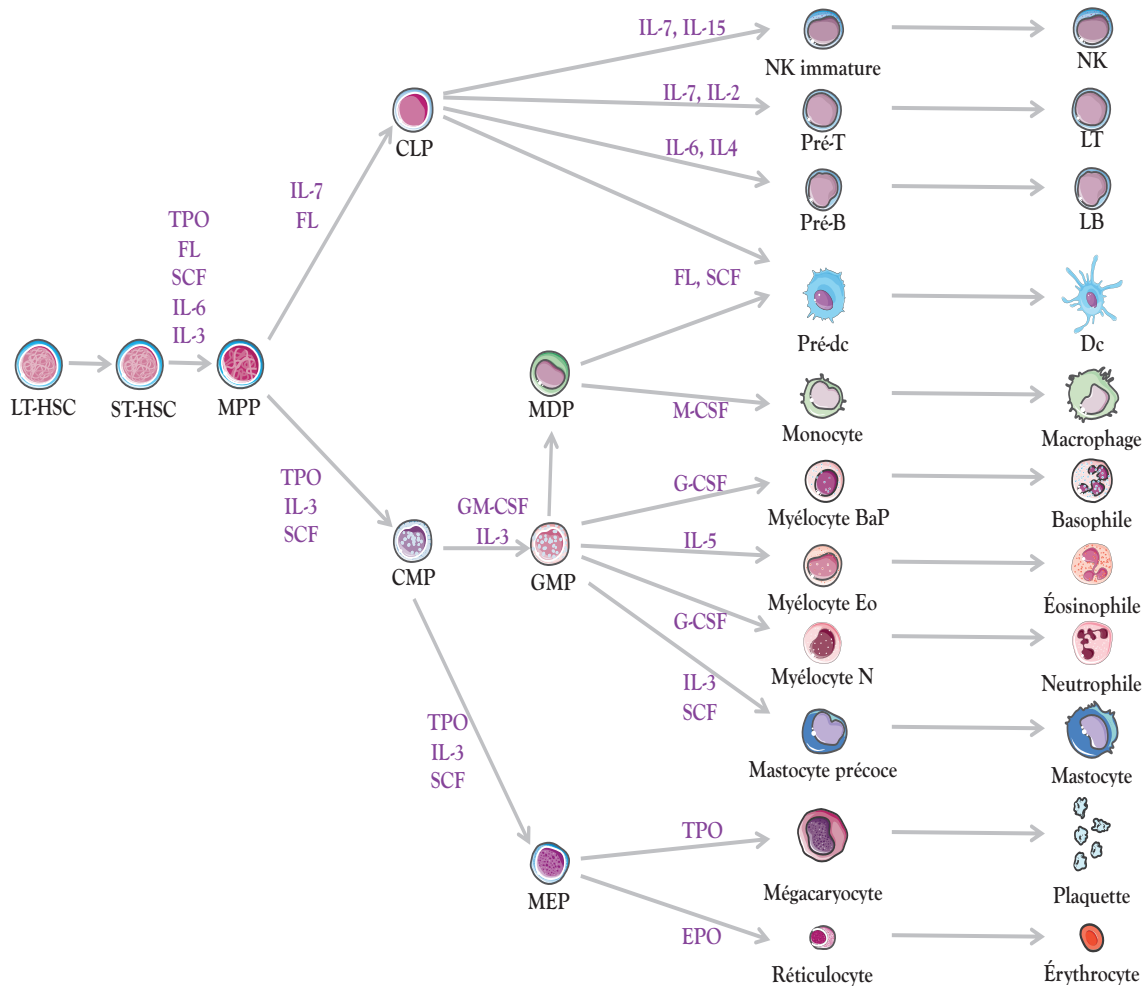


Figure 2 : Régulation de l'hématopoïèse définitive par les cytokines chez l'homme

SCF : Stem Cell Factor ; TPO : Thrombopoïétine ; FL : FLT3 ligand ; IL : Interleukine ; GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor ; M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor ; G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor ; EPO : Erythropoïétine. D'après la banque d'images Servier Medical Art et le livre « Hematopoiesis - Science and Practice », chapitre « Mechanisms controlling hematopoiesis » (Fiedler.K, 2012)

CHAPITRE II :

LES VOIES DE

SIGNALISATION DES

CYTOKINES IMPLIQUÉES

DANS L'HÉMATOPOÏÈSE

I. Les voies de signalisation des récepteurs aux cytokines

A. Les récepteurs aux cytokines

Les effets biologiques des cytokines sont associés à leurs récepteurs spécifiques, présents à la surface des cellules cibles. Ces récepteurs sont des protéines transmembranaires exprimées en faible nombre, environ 500 à 2000 récepteurs par cellule. La plupart des cellules hématopoïétiques présentent simultanément à leur surface différents récepteurs de cytokines, ce qui explique les effets redondants de différents facteurs sur une même lignée cellulaire. Les récepteurs aux cytokines semblent dériver d'un gène ancestral qui s'est dupliqué et modifié au cours de l'évolution. Ces récepteurs ont donc été classés dans une même famille appelée la « superfamille des récepteurs aux cytokines »

Il existe plusieurs types de récepteur (R) aux cytokines, classés selon leurs analogies structurales : les récepteurs aux hématopoïétines (type I), les récepteurs aux interférons (types II), les récepteurs des TNF (type III) et les récepteurs de la superfamille des immunoglobuline (Ig) (type IV) (Taniguchi, 1995). Les cytokines régulant l'hématopoïèse utilisent principalement les récepteurs de type I discutés dans cette section.

Les récepteurs de type I sont composés d'une région extracellulaire comportant des motifs de quatre résidus cystéine conservés, induisant la formation de pont disulfure intra-récepteur et des motifs W-S-X-W-S (W : tryptophane, S : sérine, X : résidu quelconque) qui permettent l'interaction des récepteurs avec leurs ligands. Pour certains récepteurs, cette région peut aussi contenir des motifs fibronectine de type III ou encore des domaines « Ig-like ». Les récepteurs de type I se caractérisent par l'absence d'activité tyrosine ou sérine/thréonine kinase intrinsèque dans leur domaine intracellulaire. A défaut, ils possèdent deux motifs nommés « box 1 » et « box 2 » essentiels à la fonction des récepteurs puisqu'ils permettent l'association de différentes molécules de signalisation, notamment des protéines tyrosine kinases cytoplasmiques (décrites dans la section suivante) qui contrôlent la transmission du signal en aval (Figure 3A).

Par ailleurs, certains de ces récepteurs, existe sous forme transmembranaire, mais aussi sous forme de protéines solubles (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, G-CSF, « leukemia inhibitory factor (LIF) », hormone de croissance (GH) et les « ciliary neutrophilic factor » (CNTF)) (Rose-John et al., 2006). Les récepteurs de type I sont divisés en quatre groupes en fonction du nombre de sous-unités et/ou des sous-unités en commun (Figure 3B). Tous partagent une chaîne α , permettant l'interaction avec une cytokine spécifique et une ou plusieurs sous-unités induisant la transduction du signal, excepté pour les récepteurs aux hormones assimilées aux cytokines. De ce fait, les trois groupes contiennent des récepteurs hétérodimériques.

Ainsi, les récepteurs du premier groupe, représentés par le récepteur à l'IL-2 (IL-4R, IL-7R, IL-9R et IL-15R), possèdent une chaîne γ (IL-2-R γ partagée par tous les récepteurs de ce groupe) en plus d'une chaîne α et/ou β . Les chaînes γ et β permettent la transduction du signal. Le récepteur à l'IL-2 est le seul à posséder trois sous-unités.

Les récepteurs du deuxième groupe, représentés par le récepteur à l'IL-3 (GM-CSFR, IL-5R), ont une chaîne β en commun, aussi appelée gp140, permettant la transduction du signal. Cette chaîne β est liée à une chaîne α .

Le troisième groupe de récepteurs est représenté par le récepteur à l'IL-6 (IL-11R, IL-12R, LIFR, CNTFR, récepteur à l'oncostatine M (OSMR). Ces récepteurs ont en commun une chaîne β , appelée gp130, étant la sous-unité permettant la transduction du signal et couplée à une chaîne α .

Le quatrième groupe est celui des récepteurs aux hormones assimilées aux cytokines composés d'un monomère (EPOR, MPL, G-CSFR, GHR, récepteur à la prolactine (PRLR) et leptine (LPR)) (Baker et al., 2007). Ces récepteurs forment des homodimères mais leur signalisation est spécifique pour chaque cytokine.

Ainsi, le fait que ces récepteurs aient en commun la sous-unité de transduction du signal permettant d'induire une réponse biologique, explique en partie la propriété de redondance de certaines cytokines.

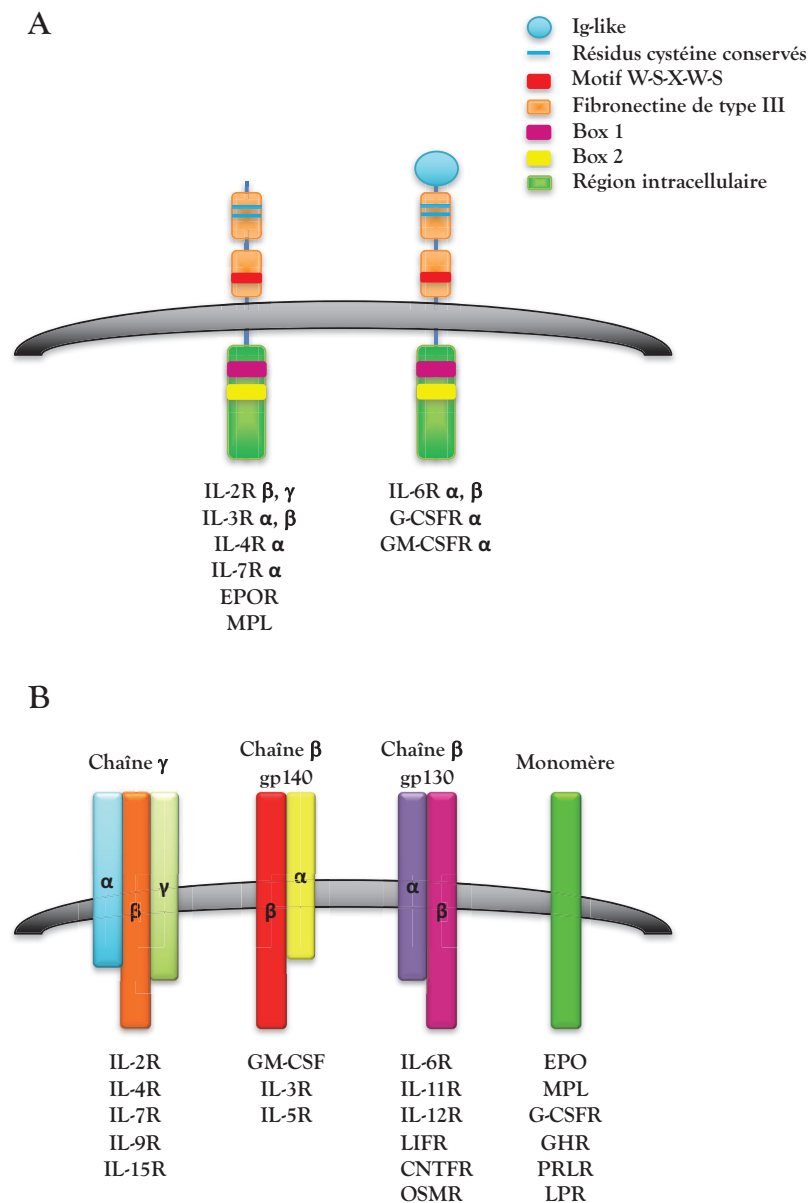


Figure 3 : Schéma des récepteurs aux cytokines de Type I

A) Composition des chaînes des récepteurs de type I. B) Classification selon les structures multimériques. De gauche à droite : récepteurs ayant en commun la chaîne γ et utilisant la chaîne α et/ou β ; récepteurs ayant en commun une chaîne β , appelée gp140, liée à une chaîne α ; récepteurs ayant en commun une chaîne β , appelée gp130, liée à une chaîne α ; récepteurs aux hormones assimilées aux cytokines composés d'un monomère. D'après Baker et collaborateurs et Taniguchi et collaborateurs (Baker et al., 2007 ; Taniguchi, 1995).

B. Les protéines de signalisation à domaines fonctionnels non-catalytiques

La liaison du ligand à son récepteur (aux cytokines, à activité tyrosine kinase ou à l'antigène) induit la dimérisation du récepteur et la phosphorylation de ses résidus tyrosine qui servent alors de sites d'ancrage de molécules de signalisation. Ces molécules peuvent avoir différentes fonctions : enzymatiques (kinases ou phosphatases), adaptatrices ou d'autres fonctions biologiques spécifiques (E3 ligases, phospholipases...). Elles peuvent posséder un ou plusieurs domaines fonctionnels dépourvus d'activité catalytique grâce auxquels elles s'associent aux récepteurs, formant ainsi des complexes de signalisation responsables de l'activation et de la régulation des voies en aval de ces récepteurs (Figure 4) (Pawson and Scott, 1997).

L'un des principaux domaines fonctionnels non-catalytiques permettant des interactions protéine-protéine est le domaine d'homologie à Src 2 (SH2), initialement identifié dans la protéine tyrosine kinase Src. Ce domaine est constitué d'une centaine d'acides aminés dont environ un tiers est fortement conservé entre tous les domaines SH2 identifiés et caractérisés jusqu'à présent, ce qui donne à tous les domaines SH2 une structure semblable. Contrairement à d'autres modules de liaison, le domaine SH2 fonctionne spécifiquement dans la signalisation dépendante des protéines tyrosine kinases du fait de sa spécificité pour des résidus tyrosine phosphorylés. En effet, ce domaine reconnaît un court motif contenant un résidu tyrosine (Y) phosphorylé suivi de trois à cinq résidus en carboxyle (C)-terminal. Cette séquence d'acides aminés, présente après le résidu tyrosine phosphorylé donne la spécificité des domaines SH2 pour ses différentes cibles phosphorylées. A titre d'exemple, le récepteur tyrosine kinase Kit possède plusieurs tyrosine phosphorylables capables de fixer différentes protéines à domaine SH2 induisant différentes fonctions biologiques. Deux d'entre elles, la Y567 et Y569, localisées dans la région régulatrice juxtamembranaire sont respectivement suivies de la séquence valine-tyrosine-isoleucine (pY567-V-Y-I) et isoleucine-asparagine-proline (pY569-I-D-P). Le domaine SH2 des kinases de la famille Src, permettant l'activation de la voie SCF/Kit, reconnaît la séquence autour de pY569, tandis que le domaine SH2 de l'adaptateur LNK, un inhibiteur de cette voie, reconnaît la séquence autour de la pY567 (Shivakrupa and Linnekin, 2005 ; Simon et al., 2008). Ainsi, le domaine SH2 permet la régulation des interactions protéine-protéine en facilitant la relocalisation réversible des protéines, ce qui joue un rôle important dans la propagation des signaux activés par les protéines tyrosine kinases (Machida and Mayer, 2005).

Le domaine « phosphotyrosine-binding domain » (PTB) reconnaît également les résidus tyrosine phosphorylés. Contrairement au domaine SH2, le domaine PTB reconnaît spécifiquement la séquence de cinq à huit acides aminés précédant le résidu tyrosine phosphorylé. Ce domaine a été initialement identifié dans la protéine adaptatrice « Src homology and collagen homology » (SHC) et par la suite, dans d'autres molécules de signalisation telles que les adaptateurs Insulin Receptor Substrat (IRS) et Downstream Of tyrosine Kinases (DOK) ou dans des protéines d'ancrage permettant le recrutement de

molécules de signalisation additionnelles. Le mode de liaison des domaines PTB est très différent de celui des domaines SH2. En effet, les domaines PTB peuvent également reconnaître des séquences non-phosphorylées contenant des résidus tyrosine, ce qui confirme l'importance de la séquence précédant la tyrosine dans la spécificité de ce domaine (Wagner et al., 2013).

Il existe d'autres domaines présents dans les molécules de signalisation qui reconnaissent d'autres résidus que la tyrosine. L'un de ces domaines est le domaine d'homologie à Src 3 (SH3), d'environ 50 acides aminés. Il s'associe principalement à des séquences peptidiques riches en résidus proline. Le rôle principal de ce domaine est de former des complexes protéiques fonctionnels, notamment avec le cytosquelette, dans des sites subcellulaires précis. Les protéines peuvent avoir plusieurs domaines SH3, comme c'est le cas des protéines « growth factor receptor bound protein 2 » (Grb2) et Vav, permettant ainsi leur association avec des ligands distincts et donnant lieu à des réponses biologiques différentes (Pawson and Scott, 1997).

Le domaine d'homologie à la Pleckstrine (PH) s'associe aux groupes chargés des polyphosphoinositides spécifiques. Il peut ainsi réguler la localisation intracellulaire des protéines de signalisation à la membrane plasmique, favorisant ainsi l'interaction de ces protéines avec leurs partenaires. De cette façon, les protéines régulatrices via leurs domaines PH peuvent coupler leurs effets aux phosphatidyl inositol kinases, phosphatases inositol et de phospholipases afin de réguler la signalisation intracellulaire (Lemmon, 2007).

Certains de ces domaines fonctionnels peuvent être situés au sein d'une même molécule de signalisation, ce qu'il leur permet d'agir en synergie et contrôler l'activation de plusieurs protéines cibles. Ainsi, les domaines fonctionnels non-catalytiques permettent d'un côté, la régulation d'un signal à un temps et un site donné, et d'un autre côté, l'amplification de ce signal en couplant un récepteur activé à de nombreuses voies de signalisation.

Tyrosine kinase cytoplasmique



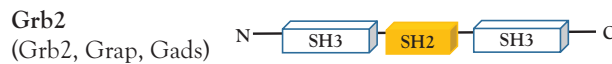
Phosphatase



Adaptateur E3 ligase



Adaptateur



Facteur de transcription



Figure 4 : Exemple de protéines contenant des domaines fonctionnels sans activité catalytique

N-terminal (N) ; C-terminal (C) ; Domaine d'interaction avec la membrane (I) ; Domaine unique (unique) ; Domaine d'homologie à Src 2 et 3 (SH2 et SH3) ; Domaine régulateur (R) ; Domaine Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moezin (FERM) ; Domaine phosphatase (PTP) ; Domaine tyrosine kinase binding (TKB) ; Domaine Really Interesting New Gene (RING) ; Région riche en proline (Pro) ; Région leucin zipper et domaine ubiquitin associated (LZ/UBA) ; Domaine d'homologie au collagène 1 et 2 (CH1 et CH2) ; Domaine phosphotyrosine binding (PTB) ; Motif Kinase Inhibitory Region (KIR) ; Domaine de dimérisation (DD) ; Domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) ; Domaine N-terminal (N-ter) ; Domaine de liaison à l'ADN (DBD) ; Domaine de transactivation (TAD).

C. La voie de signalisation JAK/STAT

Bien que les récepteurs de types I soient dépourvus d'activité catalytique, la fixation d'une cytokine à son récepteur mène à l'homodimérisation, l'hétérodimérisation ou l'oligomérisation de celui-ci. Cette association induit un changement conformationnel des récepteurs et la phosphorylation immédiate de leurs résidus tyrosine, créant ainsi des sites d'ancrages pour de nombreuses molécules de signalisation adaptatrices ou effectrices (Robb, 2007). Ceci montre que des protéines tyrosine kinases cytoplasmiques sont étroitement associées aux récepteurs de cytokines et qu'elles sont responsables de la transmission des signaux en aval du récepteur. De ce fait, l'activation des récepteurs aux cytokines permet le recrutement de plusieurs molécules de signalisation à la membrane activant différentes voies de signalisation, notamment les voies JAK/STAT, Src, Ras/MAPK et PI3K/AKT. Seules ces principales voies de signalisation seront décrites dans cette section.

1. Les tyrosine kinases de la famille JAK

Les membres de la famille des kinases Janus (JAK) se distinguent des autres protéines tyrosine kinases cytoplasmiques par la présence de deux domaines kinases en tandem, d'où leur nom Janus en l'honneur du dieu romain à deux faces (Bernards, 1991; Wilks et al., 1991).

Chez les mammifères, cette famille est constituée de quatre protéines : JAK1, JAK2, JAK3 et la « tyrosine kinase 2 » (TYK2), de masse moléculaire entre 120 et 135 kDa. Les gènes humains de ces kinases sont respectivement localisés sur les chromosomes 1p31.3, 9p24, 19p13.11 et 19p13.2. Chez l'homme et la souris, l'expression de ces kinases est ubiquitaire sauf pour la protéine JAK3 dont l'expression est restreinte aux cellules hématopoïétiques (Ghoreschi et al., 2009).

Les kinases JAK sont composées de sept régions similaires appelées région d'homologie à JAK (JH), renommées par la suite en domaine fonctionnel (Baker et al., 2007; Yamaoka et al., 2004). Les régions JH7 à JH3 représentent la région amino(N)-terminale des kinases contenant un domaine « Four-point-one, Ezrin, Radixin, Moezin » (FERM) (JH7-JH6) et un domaine assimilé au domaine SH2 (SH2-like) (JH5-JH4). Le domaine FERM permet aux kinases d'interagir constitutivement avec les motifs « box1 » et « box2 » des récepteurs aux cytokines, tandis que la fonction du domaine SH2-like n'est pas encore clairement défini. Ils sont suivis de la région JH2, appelée le domaine pseudokinase, jouant un rôle clé dans la régulation de l'activité de la kinase. Ce domaine présente une forte homologie avec le domaine kinase, cependant, il ne possède pas tous les acides aminés nécessaires à une fonction catalytique (Wilks et al., 1991). Néanmoins, de récentes études ont permis de mettre en évidence la fonction d'auto-inhibition du domaine pseudokinase de JAK2, grâce à la présence d'une faible activité catalytique. En effet, il est capable de phosphoryler des résidus tyrosine mais également sérine impliqués dans la régulation négative de la kinase. Ces résidus sont la sérine 523 et la tyrosine 570, permettant de maintenir l'activité de JAK2 à l'état basal (Ungureanu et al., 2011).

Ainsi, le domaine JH2 possède une double activité tyrosine et sérine (S) kinase, empêchant d'abord l'autophosphorylation de JAK2 lorsqu'il n'y a pas de stimulation du récepteur, grâce à la phosphorylation de la S523 puis par la phosphorylation de la Y570 (Saharinen et al., 2000). Cette fonction de JH2 est unique à JAK2 (Figure 5) (Shan et al., 2014). L'importance de l'auto-inhibition par le domaine JH2 a été mise en évidence par l'identification d'une mutation activatrice de JAK2 dans ce domaine sur le résidu valine en position 617 remplacé par un résidu phénylalanine (JAK2-V617F) dans des pathologies myéloprolifératives. Les conséquences fonctionnelles de cette mutation seront décrites dans le chapitre IV. Enfin, à l'extrémité C-terminale se trouve le domaine tyrosine kinase JH1, ayant tous les acides aminés conservés présents dans les domaines kinases des autres protéines kinases cytoplasmique (Yamaoka et al., 2004).

2. Les facteurs de transcription STAT

Les protéines Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) sont à la fois des transmetteurs de signal et des activateurs transcriptionnels. Cette famille de facteurs de transcription, inclut sept protéines nommées STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B et STAT6 qui diffèrent dans la longueur de leur région C-terminale, après épissage alternatif. Elles ont une structure moléculaire hautement conservée. En effet, elles possèdent un domaine N-terminale permettant l'interaction avec la membrane plasmique, un domaine d'oligomérisation (coiled-coil) suivi d'un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et d'un domaine « linker ». A l'extrémité C-terminale, elles ont un domaine SH2 et un domaine d'activation transcriptionnelle (ou domaine de transactivation, TAD) (Figure 5). Le domaine SH2 joue un rôle important dans la fonction de ces protéines puisqu'il permet leur interaction avec les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs et leur homo/hétérodimérisation. Quant au domaine TAD, il est impliqué dans la régulation transcriptionnelle des gènes cibles. De plus, ce domaine possède des résidus tyrosine et sérine phosphorylables jouant un rôle important dans la modulation de l'activité transcriptionnelle des protéines STAT (Dorritie et al., 2014).

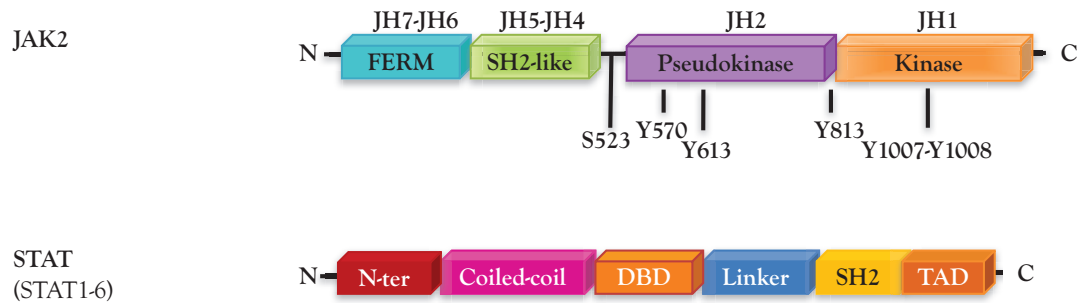


Figure 5 : Structure schématique de JAK2 et des facteurs STAT

Les kinases JAK sont composées de sept domaines d'homologie à JAK (JH7 à JH1), regroupés en quatre domaines fonctionnels : FERM, SH2-like, le domaine pseudokinase et enfin le domaine kinase. Représentation des principaux résidus sérine (S) et tyrosine (Y) important pour l'activation et la fonction de JAK2. Structure générale des protéines STAT : la région N-terminale (N-ter), le domaine coiled-coil, le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine linker, le domaine d'homologie à Src2 (SH2) et le domaine de transactivation (TAD). Extrémité N-terminale (N) et C-terminale (C).

3. Activation de la voie JAK/STAT

L'activation des kinases de la famille JAK est une étape essentielle à la transduction du signal en aval des récepteurs aux cytokines. En effet, plusieurs voies de signalisation stimulées par les cytokines sont dépendantes des kinases JAK. Les récepteurs ayant en commun la chaîne γ , utilisent les kinases JAK1 et JAK3. De plus, JAK1 est aussi essentielle pour les récepteurs ayant en commun la sous-unité β , gp130. Quant à JAK2, elle est essentielle pour la signalisation via les récepteurs aux hormones assimilées aux cytokines et ceux ayant en commun la sous-unité β , gp140. En revanche, la kinase Tyk2 est plus impliquée dans les voies de signalisation des récepteurs à IFN et ceux ayant la sous-unité β , gp130 (Yamaoka et al., 2004). Dans cette même optique, les membres de la famille STAT peuvent également s'associer à différents récepteurs de cytokines tout en étant activés par les mêmes kinases JAK, ce qui permet la spécificité dans la transmission du signal et dans la réponse biologique générée (Tableau 1).

La kinase JAK2, via son domaine FERM, est constitutivement liée sous une conformation inactive aux récepteurs de cytokines, comme c'est le cas pour les récepteurs à l'EPO et à la TPO. Comme décrit auparavant, cet état inactif de JAK2 est dû au domaine pseudokinase inhibant l'activation du domaine kinase en *cis*. Un modèle d'auto-inhibition de JAK2 en *trans*, suggère que le domaine JH2 d'une protéine JAK2 inhibe le domaine kinase d'une autre protéine JAK2 (Figure 6) (Babon et al., 2014). D'autre part, à l'état inactif, les protéines STAT sont monomériques et localisées dans le cytoplasme (Figure 7). Lorsqu'une cytokine se fixe à son récepteur, il se dimérise permettant ainsi le rapprochement des molécules de JAK présentes sur chaque monomère. A partir de ce moment, les protéines JAK sont capables de se transphosphoryler au niveau de leur boucle d'activation sur les résidus tyrosine 1007-1008 du domaine JH1. Ceci modifie la conformation des kinases et augmente leur activité catalytique. Les kinases JAK sont ainsi activées, permettant la phosphorylation des résidus tyrosine impliqués dans la régulation positive de la kinase (tyrosine 221, 637, 813, 868, 966 et 972), mais aussi la phosphorylation des résidus des domaines cytoplasmiques des récepteurs aux cytokines et leurs substrats immédiats (Babon et al., 2014).

Les résidus phosphorylés des récepteurs servent ainsi de sites d'ancrage pour différentes molécules de signalisation, en particulier les facteurs de transcription STAT (Harrison, 2012). En effet, une fois fixées aux récepteurs, les protéines STAT sont à leurs tours phosphorylées sur des résidus tyrosine par les kinases JAK. La phosphorylation des résidus tyrosine clés des protéines STAT permet leur dimérisation par l'intermédiaire de leur domaine SH2. Ainsi, l'homo- ou hétérodimère de protéines STAT, transloque dans le noyau où il se fixe au promoteur de gènes cibles spécifiques afin d'induire ou de réprimer leur transcription, résultant en diverses réponses biologiques (Figure 7).

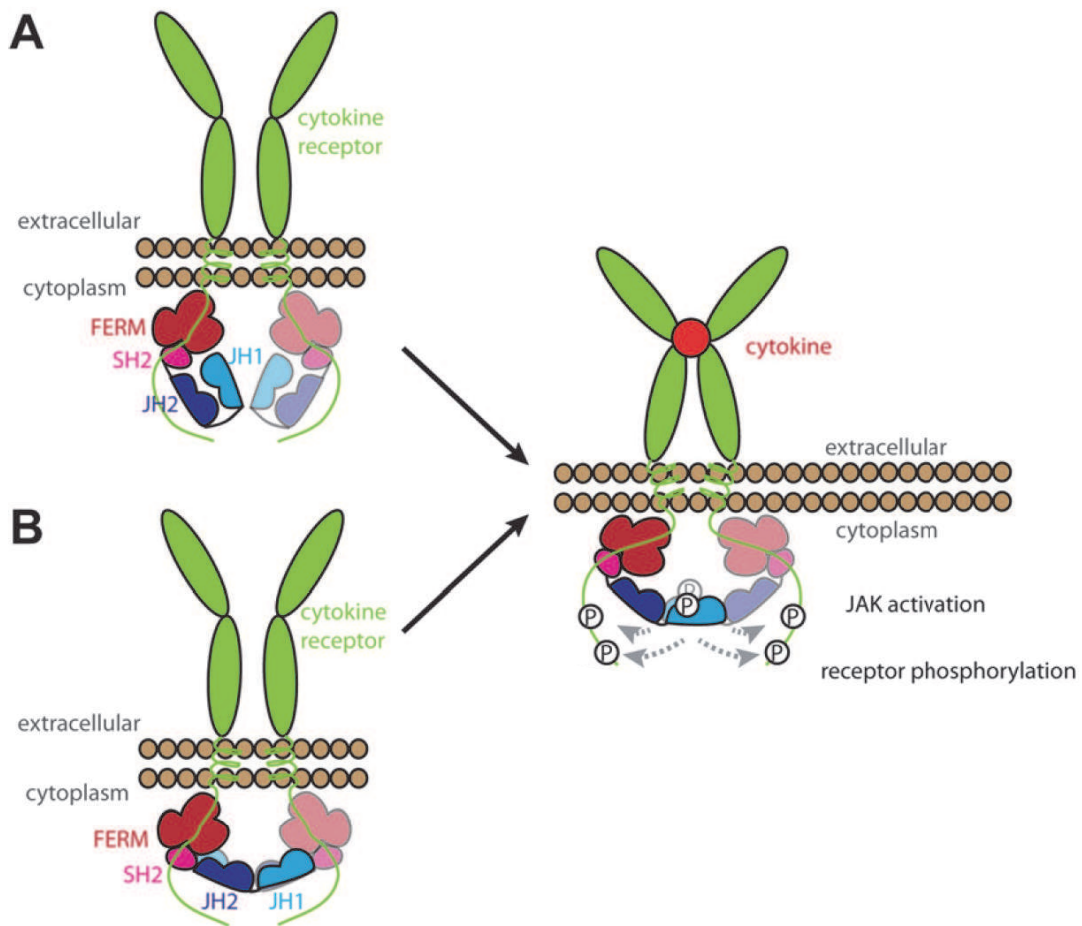


Figure 6 : Modèle d'activation de JAK2

A) Modèle de régulation de JAK2 par le JH2 en *cis*. B) Modèle de régulation de JAK2 par le JH2 en *trans*. A l'état basale, JAK2 est associée via son domaine FERM et son domaine SH2-like à un monomère du récepteur pré-dimérisé. JH2 interagit avec JH1 afin d'inhiber son activation (auto-inhibition) jusqu'à stimulation du récepteur par cytokine. D'après Babon et collaborateurs (Babon et al., 2014)

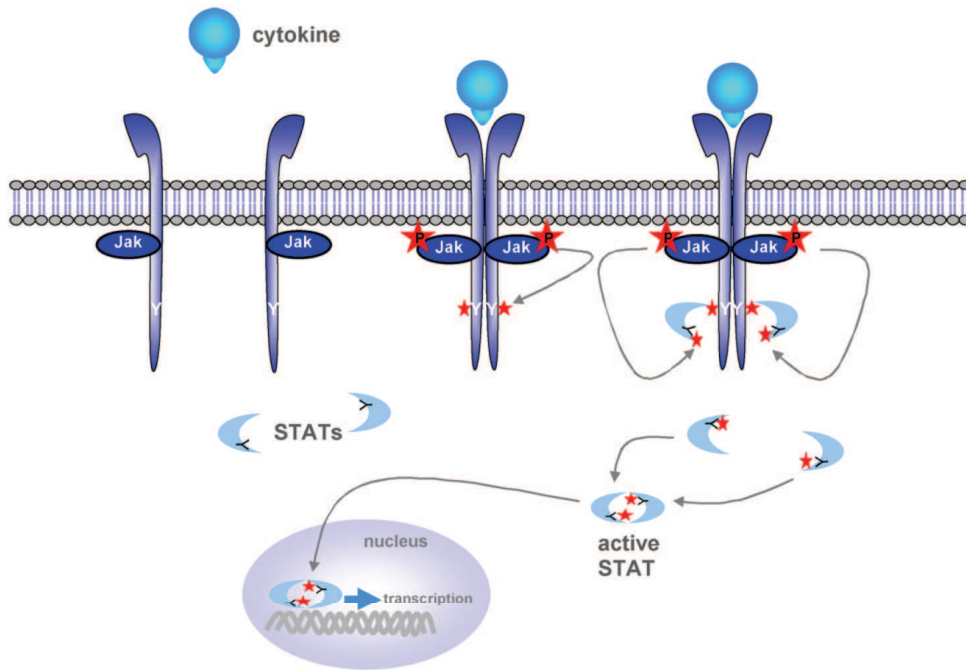


Figure 7 : Modèle d'activation de la voie de signalisation JAK/STAT

L'interaction entre la cytokine et son récepteur induit l'autophosphorylation et l'activation de JAK. La kinase JAK va phosphoryler le récepteur, créant des sites d'ancrage pour les protéines STAT. A leur tour, les protéines STAT seront phosphorylées par JAK permettant ainsi leur dimérisation et leur migration dans le noyau afin de réguler la transcription de gènes. D'après Haan et coll (Haan et al., 2006)

4. Rôle fonctionnel de la voie JAK/STAT

L'importance de la voie JAK/STAT dans les réponses biologiques induites par les récepteurs aux cytokines a été confirmée par l'analyse des phénotypes de souris invalidées pour les différentes kinases JAK et facteurs STAT (Tableau 2). Ainsi, l'étude des phénotypes de souris déficientes pour les kinases JAK a permis de comprendre le rôle spécifique et/ou redondant des cytokines. Les souris déficientes en JAK3 et TYK2 développent de sévères syndromes d'immunodéficience, suggérant l'implication de ces kinases dans le système immunitaire. Toutefois, les souris déficientes en JAK1 ou JAK2 ne sont pas viables. Les études sur JAK1, chez l'homme et la souris, ne sont pas aussi nombreuses que pour les trois autres membres de la famille. Cependant, des études menées sur des cellules dérivées de souris déficientes pour JAK1, montrent que cette kinase joue un rôle important dans la lymphopoïèse (Ghoreschi et al., 2009). Afin d'étudier le rôle de JAK2, des souris conditionnelles n'exprimant pas la kinase de manière temporaire, ont été générées. Il a été reporté que la délétion de JAK2 à 4 jours ou 2 mois postnatal entraîne une sévère insuffisance hématopoïétique et une mort prématurée des animaux. À l'âge adulte, les principales causes de mort dans ces conditions sont l'anémie ou la thrombocytopenie. Ces résultats montrent que JAK2 joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse durant la période prénatale et postnatale, notamment pour le développement érythroïde et mégacaryocytaire (Park et al., 2013). De plus, une étude menée sur des souris à l'âge adulte conclut que la kinase JAK2 est essentielle pour la fonction d'auto-renouvellement des HSC puisque sa délétion induit une perte de la quiescence des HSC, une augmentation de l'apoptose conduisant à une mort précoce des souris et des défauts des voies de signalisation utilisant les protéines intermédiaires STAT5, ERK et AKT (Akada et al., 2014).

Afin de déterminer l'importance des protéines STAT, des études ont été menées à l'aide des souris invalidées pour ces différents facteurs de transcription. L'analyse des phénotypes de ces souris met en évidence l'importance des facteurs STAT1/2/3/4/6 dans les voies de signalisation impliquées dans les réponses immunitaire et inflammatoire. En ce qui concerne les facteurs STAT5 A/B, les souris doublement déficientes pour ces protéines montrent l'importance de ces facteurs dans la voie de signalisation JAK/STAT induite par cytokines des cellules lymphoïdes et dans la mobilisation et la survie des cellules myéloïdes (Ivashkiv and Hu, 2004).

Tableau 1 : Les kinases JAK et les facteurs de transcription STAT impliqués dans la signalisation induite par les récepteurs aux cytokines (Type I).

D'après Roskoski (Roskoski, 2016)

Cytokines	JAK	STAT
Type I, chaîne γ en commun		
IL-2	JAK1/3	STAT3/5
IL-4	JAK1/3	STAT6
IL-7	JAK1/3	STAT3/5
IL-9	JAK1/3	STAT1/3/5
IL-15	JAK1/3	STAT3/5
IL-21	JAK1/3	STAT1/3/5
Type I, chaîne β (gp140) en commun		
GM-CSF	JAK2	STAT3/5
IL-3	JAK2	STAT3/5/6
IL-5	JAK2	STAT3/5/6
Type I, chaîne β (gp130) en commun		
IL-6	JAK1/2, TYK2	STAT1/3
IL-11	JAK1/2, TYK2	STAT3
IL-27	JAK1/2, TYK2	STAT1/2/3/4/5
Type I, cytokines hétérodimériques		
IL-12	JAK1, TYK2	STAT4
IL-23	JAK1, TYK2	STAT3/4
Type I, hormones assimilées aux cytokines		
EPO	JAK2	STAT5
TPO	JAK2	STAT1/3/5
G-CSF	JAK2	STAT5
GH	JAK2	STAT3/5
Leptine	JAK2	STAT3/5

Tableau 2 : Phénotype des souris KO pour les protéines JAK et STAT

D'après Babon et collaborateurs et Khwaja (Babon et al., 2014 ; Khwaja, 2006)

Gène invalidé	Viabilité	Phénotype
<i>Les kinases de la famille JAK</i>		
<i>Jak1</i>	Létal	Mort due à un défaut de signalisation au niveau neurologique et défaut de production de thymocyte
<i>Jak2</i>	Létal	Défaut de l'érythropoïèse
<i>Jak3</i>	Viable	Développement du SCID, défaut de maturation des cellules B dans la moelle osseuse, taille de la rate et du thymus diminuée, défaut de fonctionnement des lymphocytes T
<i>Tyk2</i>	Viable	Défaut de réponse immunitaire des macrophages et des lymphocytes T
<i>Les facteurs de transcription STAT</i>		
<i>Stat1</i>	Viable	Défaut de réponse immunitaire via la signalisation des interférons, sensibilité aux microbes et développement de tumeurs.
<i>Stat2</i>	Viable	Défaut de réponse immunitaire via la signalisation des interférons
<i>Stat3</i>	Létal	Défaut de croissance et survie/différenciation cellulaire durant l'embryogénèse
<i>Stat4</i>	Viable	Défaut de réponse à l'IL-12 et de la différenciation des Th1
<i>Stat5a</i>	Viable	Défaut de réponse à la prolactine (développement des glandes mammaires)
<i>Stat5b</i>	Viable	Défaut de réponse à GH (croissance)
<i>Stat5a/b</i>	Viable	Défauts des souris KO STAT5A et B, et défaut de réponse aux lymphocytes T et des voies de signalisation dans les HSC
<i>Stat6</i>	Viable	Défaut de réponse à l'IL-4 et de la différenciation des Th2

Severe combined immunodeficiency (SCID), knock-out (KO); lymphocyte T-helper (Th1 et 2)

D. La voie de signalisation des kinases de la famille Src

La voie de signalisation JAK/STAT est celle principalement activée par les différents récepteurs aux cytokines. Cependant, ces récepteurs activent également d'autres familles de tyrosine kinases cytoplasmiques, telle que la famille des kinases Src. Cette famille est composée de huit membres : Src, Yes et Fyn exprimés de manière ubiquitaire et Lck, Hck, Lyn, Fyr et Blk majoritairement exprimées dans les cellules hématopoïétiques. Ces protéines jouent un rôle dans la prolifération, la différenciation, la survie, l'adhésion et la motilité cellulaire (Roskoski, 2015). La fixation des kinases Src, sur les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs aux cytokines, permet le recrutement et la phosphorylation de différentes protéines de signalisation, dont les facteurs STAT (Figure 8). Cette voie alternative d'activation des STAT est indépendante de l'activation des JAK. Différentes études ont mis en évidence la phosphorylation de STAT3 par plusieurs membres de la famille Src après stimulation par IL-3, ainsi que l'activation de STAT5 par la kinase Lyn dans la voie de signalisation du récepteur à l'EPO (Reddy et al., 2000 ; Tilbrook et al., 1997). De manière intéressante, il a été montré que les kinases Src induisent la phosphorylation des STAT sur des sites autres que ceux phosphorylés par les kinases JAK. Ces résultats suggèrent donc un mécanisme alternatif d'activation des STAT induisant des réponses biologiques différentes de celles stimulées par la voie classique des JAK (Silva, 2004). Il a également été montré que les kinases Src jouent un rôle dans la signalisation induite par les récepteurs possédant une activité tyrosine kinase, tel que le récepteur Kit. Ces kinases sont capables de se lier aux récepteurs aux cytokines afin d'augmenter leur activité kinase. Des études ont montré que, dans des cellules mégacaryocytaires et mastocytaires, la kinase Lyn induit la prolifération cellulaire après stimulation par le SCF. Ces données mettent en évidence l'importance de cette kinase dans la prolifération de ces cellules hématopoïétiques via le récepteur Kit (Lennartsson and Ronnstrand, 2012).

E. La voie de signalisation impliquant Ras/MAPK

Une autre voie de signalisation utilisée par la plupart des récepteurs aux cytokines est la voie des protéines Ras et « mitogen-activated protein kinase » (MAPK). Les MAPK sont des sérine/thréonine kinases qui requièrent la phosphorylation d'une thréonine (T) et d'une tyrosine (Y) sur le motif (T-X-Y) pour être actives. Les MAPK sont classées en quatre groupes : les protéines Extracellular signal-Related Kinase 1/2 (ERK), ERK 5, les p38MAPK $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ et les c-Jun N-terminal Kinase 1/2/3 (JNK). L'activation de la voie MAPK commence par le recrutement sur les récepteurs aux cytokines phosphorylés de l'adaptateur SHC et du complexe composé par les protéines Grb2 et du facteur d'échange « son of sevenless-1 » (SOS-1). Ce dernier permet alors l'activation des GTPases Ras ancrées à la membrane plasmique. Les protéines Ras vont ensuite activer les sérine/thréonine kinases Raf qui induiront la

phosphorylation et l'activation des protéines « MAP (ERK) kinase » (MEK) qui sont à la fois des sérine/thréonine kinases et des tyrosine kinases. Ces kinases vont à leur tour activer les MAPK par une double phosphorylation des résidus T et S. Par la suite, les MAPK seront transloquées vers le noyau. Elles vont pouvoir activer des facteurs de transcription afin de contrôler l'expression de protéines impliquées dans la différenciation ou le cycle cellulaire par exemple (Figure 8) (Baker et al., 2007 ; Severin et al., 2010).

F. La voie de signalisation impliquant PI3K/AKT

La « Phospho-Inositide-3 Kinase » (PI3K) est un hétérodimère composé d'une sous-unité catalytique p110 (quatre isoformes : α , β , γ , δ), ainsi que d'une sous-unité régulatrice p85 (deux isoformes : α , β) ou p50 α ou p55 (deux isoformes : α , γ). Cette voie de signalisation peut être stimulée par différents facteurs de croissance dont ceux impliqués dans l'hématopoïèse comme le SCF, le « platelets-derived growth factor » (PDGF), l'EPO, la TPO, l'IL-2 et le GM-CSF. La PI3K phosphoryle des phospholipides membranaires tels que le phosphatidilinositol-4-5 biphosphate (PIP2) générant le phosphatidilinositol-3-4-5 triphosphate (PIP3). Ce dernier constitue, la plupart du temps, un messager secondaire impliqué dans de nombreux processus dont le contrôle du trafic membranaire et la transduction de signal. La sous-unité p110 est responsable de l'activité catalytique de la kinase, tandis que la sous-unité p85 fonctionne comme un adaptateur, permettant l'interaction avec les protéines cibles grâce à la présence des différents domaines fonctionnels dans sa structure. La voie PI3K est activée par la fixation de la sous-unité p85 de PI3K, sur des résidus tyrosine phosphorylés du récepteur par JAK2. Ceci permet la formation de PIP3, qui à son tour, recrute la Ser/Thr/Tyr kinase AKT via son domaine PH au niveau de la membrane plasmique. Une fois activée, AKT phosphoryle de nombreuses cibles impliquées dans la survie cellulaire et dans la prolifération (Reddy et al., 2000). La voie PI3K peut être également activée par un complexe protéique capable de s'associer à la sous-unité p85. Ce complexe est constitué des protéines Grb2/Shc/SOS-1, ainsi que de la protéine Cbl qui aurait, ici, un rôle d'adaptateur. Le rôle de la PI3K dans l'hématopoïèse a été montré à partir de lignées cellulaires et de progéniteurs primaires. Elle est impliquée dans la voie de signalisation permettant le maintien de la quiescence des HSC, la survie et l'induction du cycle cellulaire des mégacaryocytes en réponse à la TPO. Suite à une stimulation des progéniteurs érythroïdes précoces par l'EPO, la PI3K joue un rôle dans la prolifération, la survie et la maturation. Le rôle de cette kinase dans la lymphopoïèse B a été mis en évidence en supprimant sa sous-unité régulatrice. Cette suppression provoque alors l'arrêt du développement des lymphocytes B. En revanche, aucun effet sur les lymphocytes T n'a été constaté (Figure 8) (Polak and Buitenhuis, 2012).

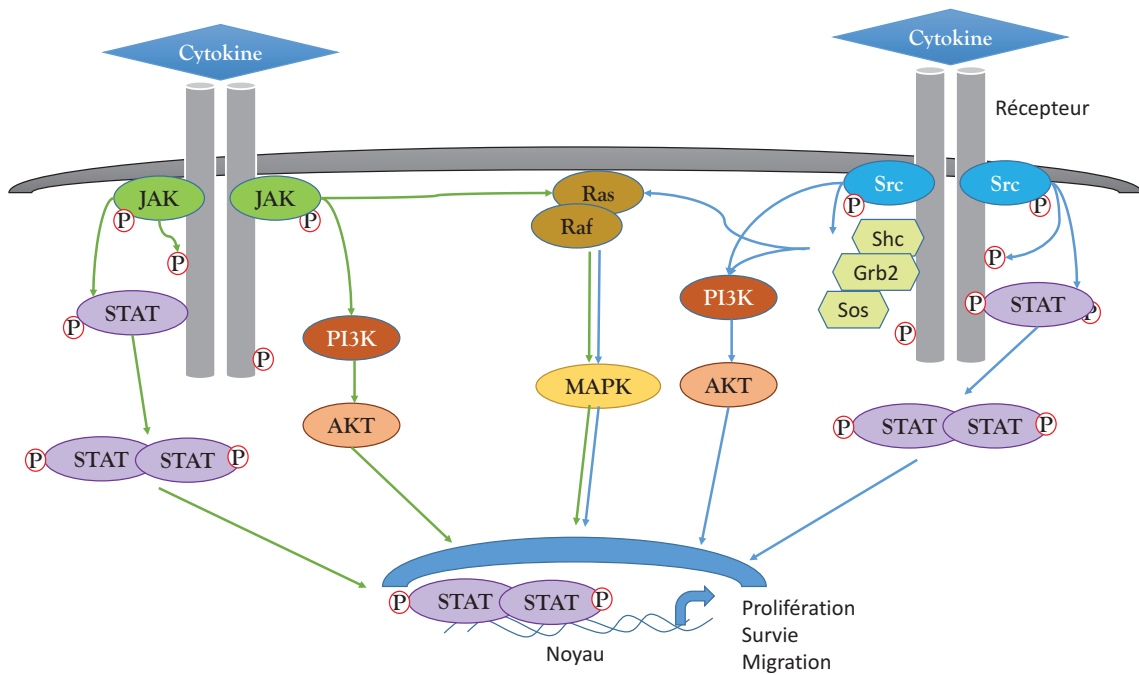


Figure 8 : Les principales voies de signalisation induites par cytokines

Les flèches vertes représentent les protéines activées par JAK et les bleues celles activées par Src ; Résidus phosphorylés (P). D'après Baker et collaborateurs et Reddy et collaborateurs (Baker et al., 2007 ; Reddy et al., 2000).

II. Régulation négative des voies de signalisation des récepteurs aux cytokines

La production contrôlée de différents lignages hématopoïétiques, nécessite une régulation très précise afin de maintenir l'homéostasie du système. Cette régulation se traduit au niveau moléculaire, par la modulation de la durée et de l'intensité de l'activation des cascades de signalisation activées par les cytokines. En effet, la dérégulation de cette signalisation est associée à des pathologies hématologiques (voir chapitre IV) et immunes.

La régulation négative des voies de signalisation activées par les cytokines agit à tous les niveaux de la cascade. Cette régulation a lieu principalement par l'inactivation du récepteur et des molécules intermédiaires de signalisation soit par leur internalisation et dégradation, soit par leur déphosphorylation. Ces mécanismes sont initiés grâce au recrutement des protéines adaptatrices inhibitrices possédant ou non une activité enzymatique au sein des complexes de signalisation. Ces adaptateurs jouent un rôle primordial dans la régulation de la réponse quantitative et qualitative des voies de signalisation. De plus, certaines de ces protéines peuvent également avoir une activité enzymatique, de type ubiquitine ligase ou phosphatase (Figure 9). Ainsi, ces adaptateurs inhibiteurs modulent la stabilité, l'adressage subcellulaire et la fonction des complexes de signalisation.

Parmi ces adaptateurs, se trouvent deux classes des protéines possédant une activité enzymatique, jouant un rôle important dans la régulation des voies dépendantes des cytokines. La première classe concerne les phosphatases de la famille « SH2-containing phosphatases » (SHP), tandis que la deuxième classe est constituée des E3 ligases de la famille « Casitas B-lineage Lymphoma » (Cbl). Les familles de protéines « Suppressor Of Cytokines Signaling » (SOCS) et LNK sont, par exemple, des adaptateurs négatifs dépourvus d'activité enzymatique et impliqués dans les voies des cytokines.

Ces protéines inhibitrices et leur implication dans la modulation des voies de signalisation des cytokines seront décrites brièvement dans cette section, à l'exception de la famille LNK qui fera l'objet d'une description plus détaillée au chapitre suivant.

Phosphatase

SHP
(SHP1/2)



Adaptateur E3 ligase

Cbl
(Cbl, Cblb)



(Cbl-c)



Adaptateur

SOCS
(SOCS2/4/5/6/7, CIS)



(SOCS 1/3)



Figure 9 : Représentation schématique des structures des protéines SHP, Cbl et SOCS

A) Structure des phosphatases SHP : deux domaines SH2 et un domaine phosphatase (PTP). Structure des protéines Cbl : un domaine « tyrosine kinase-binding » (TKB) composé des domaines 4H, EF et SH2, un motif ring-finger suivi d'un domaine linker, d'une région riche en proline (Pro), de résidus tyrosine phosphorylables et d'une leucine zipper (LZ) avec une « ubiquitin associated » (UBA). Structure des protéines SOCS, avec un motif Kinase Inhibitory Region (KIR). D'après le livre « Hematopoiesis - Science and Practice », chapitre « Negative régulation of haematopoiesis: role of inhibitory adaptor » (Neel and Tonks, 1997; Velazquez, 2012a).

A. Régulation via des protéines avec activité catalytique

1. Les phosphatases de la famille SHP

L'activation des voies de signalisation, stimulées par cytokines, implique généralement la phosphorylation de protéines de signalisation. De ce fait, un des mécanismes mis en place pour leur régulation est leur inactivation par déphosphorylation. Ce rôle est attribué aux protéines phosphatases, telle que la « PhosphoTyrosine Phosphatase » (PTP). Parmi les PTP, la famille SHP joue un rôle primordial dans la régulation de voies de cytokines. Cette famille possède deux membres ; SHP-1 dont l'expression est essentiellement hématopoïétique et épithéliale, et SHP-2 dont l'expression est ubiquitaire. A la différence de SHP-1, SHP-2 est un régulateur positif des voies de signalisation. Ces PTP sont composées de deux domaines SH2 consécutifs dans leur région N-terminale, leur permettant de se lier aussi bien aux résidus tyrosine phosphorylés du récepteur qu'aux molécules de signalisation phosphorylées. Quant à leur région C-terminale, elle contient un domaine catalytique phosphatase (PTP) (Figure 9). Ainsi, SHP-1 peut s'associer à ses cibles, notamment les kinases JAK, Src et les facteurs de transcription STAT. Cette association conduit à l'activation enzymatique de SHP-1 et à la déphosphorylation de ses protéines cibles, résultant en l'inhibition des signaux. L'importance biologique de SHP-1 a été montrée avec des souris invalidées pour cette protéine et qui présentent un phénotype appelé « motheaten ». Leur phénotype est caractérisé par des dysfonctionnements d'ordre immunologique et hématopoïétique importants dus à une hyperphosphorylation de JAK1 et JAK2 en réponse à l'IFN α et l'EPO entre autres cytokines (Babon et al., 2014 ; Green and Shultz, 1975 ; Sharma et al., 2016).

2. Les protéines de la famille E3 ligase Cbl

Chez les mammifères, il existe trois protéines constituant la famille Cbl : Cbl et Cbl-b puis la protéine Cbl-c, tronquée en C-terminal (Figure 9). Ces protéines possèdent dans leur région N-terminale un domaine unique à la famille Cbl nommé « Tyrosine Kinase Binding » (TKB) constitué lui-même de trois parties : une région avec quatre hélice (4H), un domaine « main-EF » permettant la liaison au calcium et un domaine SH2. Ce domaine est suivi d'un « linker » et d'un domaine « Really Interesting New Gene » (RING finger) facilitant l'interaction avec l'enzyme conjuguée aux ubiquitines, E2. L'ensemble de ces domaines forme le module E3 des protéines Cbl, essentiel à leur activité ubiquitaire. Leur région C-terminale permet leur association avec d'autres protéines, telle que celles de la famille Src, via un domaine riche en proline et des résidus tyrosine phosphorylables. Ces résidus deviennent des sites d'ancrage après phosphorylation pour les protéines de signalisation contenant des domaines SH2. Ces régions sont suivies d'une région « leucine zipper » (LZ) et d'un domaine « ubiquitin associated » (UBA) dont la fonction n'est, à notre connaissance, toujours pas clairement décrite (Figure 9 et 10). En effet, dans certaines conditions expérimentales le domaine UBA pourrait participer à la dimérisation de la protéine ou alors se lier à une chaîne d'ubiquitination. Quant à la protéine

Cbl-c, elle ne contient que les domaines TKB, linker et RING finger. Les recherches menées sur la famille Cbl, *in vivo* et *in vitro*, définissent ces protéines comme des régulateurs négatifs des voies de signalisation activées par des protéines tyrosine kinases telles que les voies de signalisation impliquant Ras/ERK, PI3K/AKT et STAT. L'analyse des souris déficientes pour Cbl ou Cbl-b a montré que ces protéines régulent négativement la prolifération cellulaire dans les organes lymphoïdes, la moelle osseuse et la rate où elles contrôlent aussi le nombre de mégacaryocytes. De plus, elles permettent aussi de réguler négativement la prolifération des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques. Ces souris peuvent développer des maladies auto-immunes dues à un défaut de contrôle des voies de signalisation des récepteurs aux antigènes dans les cellules lymphoïdes. Les protéines Cbl et Cbl-b jouent aussi un rôle dans le développement embryonnaire chez la souris, puisque ces animaux double mutants pour ces protéines meurent au stade précoce du développement embryonnaire (Mohapatra et al., 2013).

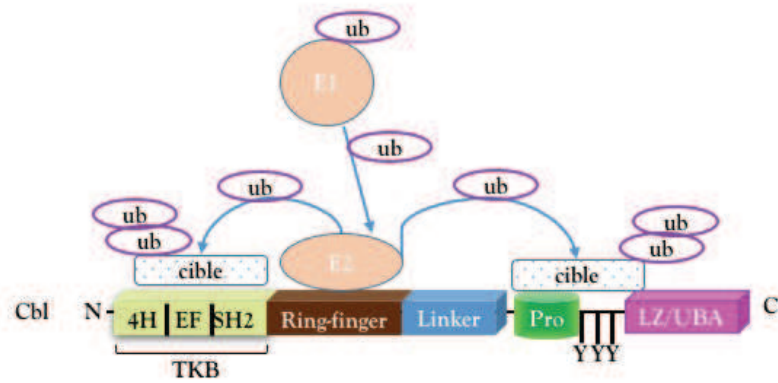


Figure 10 : Mécanisme d'ubiquitination des protéines Cbl

La protéine E2 se fixe au domaine Ring-finger. L'enzyme E1 conjuguée à l'ubiquitine (ub) interagit avec E2 qui va ensuite transférer l'ubiquitine aux protéines cibles. D'après Mohapatra et collaborateurs (Mohapatra et al., 2013).

B. Régulation via les protéines adaptatrices inhibitrices

Comme décrit auparavant, les protéines adaptatrices, dépourvues de fonction catalytique, sont composées de plusieurs domaines fonctionnels leur permettant de réguler les voies de signalisation en interagissant avec les protéines impliquées dans la transduction du signal. Ces adaptateurs peuvent être transmembranaire ou cytoplasmique, ce qui leur permet d'être recrutés à la membrane afin d'exercer leur fonction dans des compartiments intracellulaires.

Des expériences d'inactivation chez la souris et de surexpression dans les lignées cellulaires ont démontré que les adaptateurs négatifs sont généralement impliqués dans des mécanismes de retro-régulation. Ces données ont permis également d'établir trois modes d'action différents de ces adaptateurs :

- 1) Par l'inhibition directe de l'activité des tyrosine kinases associées aux récepteurs de cytokine ou des RTK ;
- 2) Par blocage des associations entre les tyrosine kinases et ses substrats/effecteurs positif en aval ;
- 3) Par association et modification des molécules de signalisation pour leur dégradation par le protéosome.

Les familles SOCS et LNK sont des exemples d'adaptateurs négatifs utilisant ces mécanismes d'action pour exercer leur fonction inhibitrice.

1. Les protéines de la famille SOCS

Les protéines SOCS sont des inhibiteurs dont l'expression est induite par des cytokines et des facteurs de croissance. Leur rôle est d'exercer un rétrocontrôle négatif sur ces voies afin de contrôler les réponses cellulaires. Cette famille de protéines compte huit membres SOCS1 à SOCS7 et « Cytokine-induced SH2- domain containing » (CIS) caractérisés par un domaine N-terminal dont la séquence et la longueur varient selon les membres, un domaine SH2 central et un domaine « SOCS box » très conservé dans tous les membres de la famille. SOCS1 et SOCS3 se distinguent des autres membres par la présence d'un motif « Kinase Inhibitory Region » (KIR) en amont du domaine SH2 (Figure 9). Grâce à ce motif, les protéines SOCS1 et SOCS3 sont capables d'inhiber l'activité de JAK1, JAK2 et TYK2 de manière directe en se liant aux résidus tyrosine phosphorylés de la boucle d'activation. Cette association entraîne alors un changement de conformation de la kinase empêchant ainsi l'interaction avec leurs substrats et/ou leur phosphorylation. L'inhibition de ces kinases peut aussi se faire de manière indirecte. En effet, SOCS3 possède une meilleure affinité pour les résidus tyrosine phosphorylés des récepteurs associés à JAK plutôt qu'à la kinase JAK elle-même. Ainsi, la liaison de SOCS sur le récepteur via son domaine SH2 permet, d'une part, de masquer les sites d'interaction des substrats des kinases JAK (par exemple STAT). D'autre part, elle permet de recruter des protéines impliquées dans la formation du complexe E3 ligase via le motif « SOCS box », ce qui

entraîne l'internalisation et la dégradation du récepteur, via la voie protéosomale. Ce mécanisme d'ubiquitination est aussi valable pour les autres cibles protéiques des SOCS, tels que les kinases JAK et les facteurs de transcription STAT (Figure 11) (Linossi and Nicholson, 2015). A titre d'exemple, la protéine CIS, dont l'expression est induite par l'IL-3, est capable de se lier au site de recrutement de STAT5 sur les domaines cytoplasmiques des récepteurs à l'IL-3, l'EPO ou encore le GM-CSF. Cette association met ainsi CIS en compétition avec le facteur de transcription, ce qui empêche la phosphorylation de STAT par la kinase JAK2 et entraîne la dégradation du complexe de signalisation. Les souris invalidées pour les protéines de cette famille ont montré que ces adaptateurs jouent un rôle important dans les réponses immunitaires et dans le développement de ces animaux. De plus, des mutations de types hyperméthylations ou hyperphosphorylations de ces adaptateurs ont été identifiées dans plusieurs pathologies humaines telles que les lymphomes ou encore les néoplasmes myéloprolifératifs (Croker et al., 2008 ; Naudin et al., 2016).

2. Les protéines de la famille LNK

La famille LNK (aussi appelée SH2B) inclut trois protéines adaptatrices qui jouent un rôle de régulateur négatif mais aussi positif dans certains cas. Cette famille de protéine étant l'objet principal de mon étude, elle sera décrite plus en détail dans le chapitre suivant.

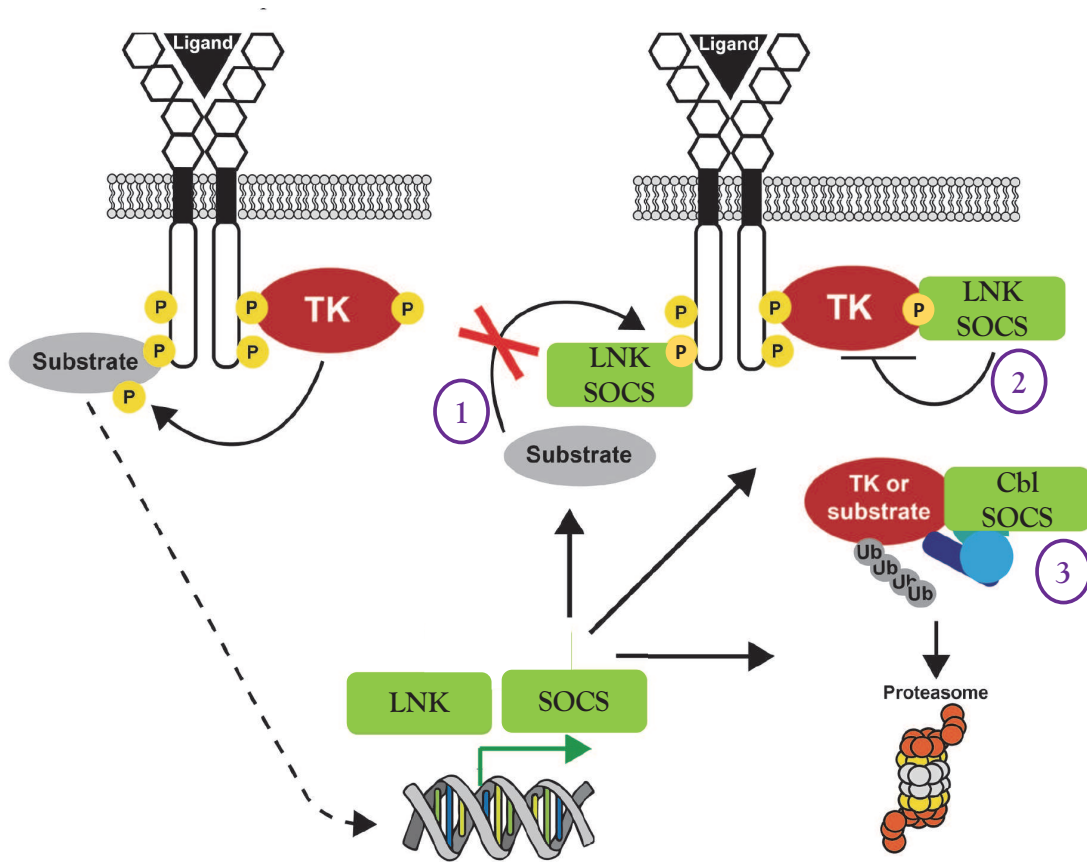


Figure 11 : Modèle d'action des protéines adaptatrices

La stimulation des récepteurs induit l'expression de protéines adaptatrices qui peuvent réguler négativement la voie de signalisation en entrant en compétition avec les substrats des kinase (1), en bloquant directement leur activité (2). Elles peuvent aussi induire l'ubiquitination des kinases ou de leur substrat qui mènera à leur dégradation (3). D'après Naudin et collaborateurs (Naudin et al., 2016).

CHAPITRE III :

LES PROTÉINES

ADAPTATRICES DE LA

FAMILLE LNK

I. Origine et expression cellulaire

La famille LNK est composée de trois membres : « Src homology 2-B » (SH2-B, aussi nommé PSM : « proline-rich, PH and SH2 domain-containing signalling Mediator »), « Adaptor protein with PH and SH2 domain » (APS) et LNK exprimés dans différents tissus et systèmes cellulaires (Tableau 3). Cette famille a été également appelée famille SH2B par le « HUGO Gene Nomenclature Committee » qui a respectivement renommé les trois membres SH2-B, APS et LNK par SH2B1, SH2B2 et SH2B3 (Li et al., 2007b; Maures et al., 2007). Cependant, les noms originaux seront utilisés dans ce manuscrit.

Ces protéines adaptatrices ne possèdent pas de domaine catalytique et utilisent donc leurs domaines fonctionnels afin d'interagir avec leurs partenaires et de réguler les voies de signalisation. Ce chapitre décrit les membres de la famille LNK, néanmoins, la protéine adaptatrice LNK sera davantage mise en évidence.

L'adaptateur LNK a été le premier membre de la famille à être identifié. Chez les mammifères, il en existe qu'une seule forme mise en évidence à partir d'une banque d'ADNc issue des ganglions lymphatiques de rat et de souris, avec une taille d'environ 38 kDa (Huang et al., 1995 ; Takaki et al., 1997). Par la suite, d'autres études ont montré que la protéine LNK est en fait deux fois plus importante en taille que la protéine initialement identifiée, environ 70 kDa (Li et al., 2000 ; Takaki et al., 2000 ; Velazquez et al., 2002). LNK est préférentiellement exprimé dans les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques, ainsi que dans des cellules matures, telles que les mastocytes, les mégacaryocytes et les plaquettes. Cette expression est à son tour induite par plusieurs cytokines et facteurs de croissance essentiels à l'hématopoïèse comme le SCF, l'EPO et la TPO (Velazquez et al., 2002). Cet adaptateur est aussi exprimé dans des cellules non-hématopoïétiques, tels que les progéniteurs et les cellules matures endothéliales (Fitau et al., 2006 ; Kwon et al., 2009; Wan et al., 2006) et, les cellules neuronales dans lesquelles son expression est induite par le TNF α et le « Nerve Growth Factor » (NGF), respectivement (Wang et al., 2011). De plus, LNK est aussi présent dans des tissus, tels que les testicules, les muscles et le cerveau (Tableau 3) (Velazquez et al., 2002).

Contrairement à LNK, il existe quatre isoformes de SH2-B (α , β , γ , δ) chez les mammifères. Ces quatre isoformes résultent d'un épissage alternatif du gène *SH2B1* qui donne quatre protéines de tailles distinctes. Leur différence réside dans la longueur de la région C-terminale (Figure 12) (Yousaf et al., 2001). Les protéines α , β , γ ont été clonées grâce au système de sélection double et triple-hybride dans la levure, en utilisant comme appât le domaine catalytique du récepteur à l'insuline activé et la sous-unité gamma du récepteur à l'immunoglobuline E (IgE), Fc ϵ RI, (Osborne et al., 1995 ; Riedel et al., 1997). Par la suite, une variante de SH2-B α , appelée SH2-B β , a été identifiée étant capable d'interagir avec JAK2 (Rui et al., 1997). Quant à la forme SH2-B γ , elle interagit avec les résidus tyrosine phosphorylés du domaine kinase du récepteur à l'insuline (Nelms et al., 1999). En revanche, l'identification de l'isoforme δ a été réalisée en étudiant les séquences des autres isoformes, afin de prédire

l'épissage alternatif du gène *SH2B1*. Ces protéines sont principalement exprimées dans les cellules non-hématopoïétiques, telles que, les cellules adipocytaires, neuronales, gonadiques, pulmonaires, pancréatiques et celles des muscles squelettiques (Tableau 3).

Concernant la protéine APS, elle a été clonée à partir d'une banque d'ADNc dérivée d'une lignée lymphocytaire B ou d'adipocytes par la méthode de double hybride en utilisant comme appât le récepteur Kit ou celui de l'insuline (Ahmed et al., 1999 ; Moodie et al., 1999 ; Yokouchi et al., 1997). Ensuite l'isoforme APS β a été mis en évidence par épissage alternatif de l'ARNm. L'analyse structurale de ces isoformes a montré que APS α a une structure similaire aux protéines SH2-B et LNK, cependant, APS β est tronquée après le domaine PH (Figure 12) (Li et al., 2007a). Ainsi, APS est exprimée dans les cellules hématopoïétiques, notamment dans les lymphocytes B matures et les mastocytes. Cependant, elle est également fortement exprimée dans d'autres tissus comme les adipocytes, les neurones et le muscle squelettique.

Tableau 3: Expression cellulaire et tissulaire des protéines de la famille LNK

Adaptateur	Cellules	Tissus	Références
LNK	HSC, progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes, cellules matures (mastocytes, mégacaryocytes et plaquettes) Progéniteurs et cellules matures endothéliales Neurones	Cerveau	(Huang et al., 1995) (Takaki et al., 1997) (Velazquez et al., 2002) (Fitau et al., 2006) (Wang et al., 2011)
		Testicules	
		Muscles	
		Ganglions lymphatiques	
		Rate	
		Poumons	
APS	Lymphocytes B matures Mastocytes Adipocytes Fibroblastes Neurones	Foie foetal	(Yokouchi et al., 1997) (Iseki et al., 2000)
		Reins	
		Moelle osseuse	
		AGM	
		Rate	
		Prostate	
		Utérus	
		Testicules	
		Petit intestin	
		Muscle squelettique	
SH2-B	Adipocytes Neurones corticaux Leucocytes du sang périphérique	Cerveau	(Osborne et al., 1995) (Kotani et al., 1998) (Nelms et al., 1999) (Rui et al., 1997) (Nishi et al., 2005)
		Rein	
		Tissus adipeux	
		Rate	
		Gonades	
		Cerveau	
		Colon	
		Placenta	
		Foie	
		Muscle squelettique	
		Cœur	
		Pancréas	

II. Structure des protéines de la famille LNK

Les protéines de la famille LNK possèdent de la région N-terminale à la région C-terminale : un domaine de dimérisation (DD), des motifs riches en proline suivi des domaines PH et SH2, ainsi que de nombreux résidus sérine et tyrosine potentiellement phosphorylables par les kinases (Figure 12) (Maures et al., 2007 ; Velazquez, 2012b).

A. La région N-terminale

La région N-terminale des adaptateurs de cette famille comprend un domaine de dimérisation d'environ 60 acides aminés avec une faible homologie entre les membres (Figure 12). Il a été montré que les protéines SH2-B et APS, via cette région, peuvent s'homodimériser ou hétérodimériser dans des neurones corticaux et dans la lignée cellulaire HEK293T transfectée après stimulation du récepteur TrkA et que ces deux adaptateurs s'oligomérisent préférentiellement sous forme de pentamères (Qian and Ginty, 2001). En effet, l'analyse cristallographique de APS a mis en évidence l'importance de résidus phénylalanine qui jouent le rôle d'un motif de fermeture éclair ou « phénylalanine zipper », permettant la dimérisation de APS (Dhe-Paganon et al., 2004). La position de ces résidus phénylalanine est très conservée entre les protéines APS et SH2-B, ce qui a permis de modéliser la région N-terminale de SH2-B à partir de la structure d'APS (Nishi et al., 2005) et de confirmer la présence de ce même motif « phénylalanine zipper » sur SH2-B (Figure 13). Ces résultats expliquent la possibilité d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation de ces deux protéines, ainsi que leur capacité à former des tétramères entre elles et avec deux molécules de leur partenaire principal, la kinase JAK2 (Nishi et al., 2005). Contrairement à APS et SH2-B, le domaine de dimérisation de l'adaptateur LNK présente moins d'homologie avec les domaines de deux autres membres. En l'occurrence, des résidus phénylalanine conservés en position 38 et 42, important pour la dimérisation de APS et SH2-B, sont remplacés respectivement par des résidus leucine et tyrosine dans LNK. De ce fait, LNK possède alors un motif « leucine zipper » en région N-terminale (Figure 13). La différence entre le domaine de dimérisation de LNK et ceux de SH2-B et APS est probablement ce qui affecte son hétérodimérisation avec les autres protéines de la famille. Cependant, LNK reste capable de s'homodimériser *in vitro* (Takizawa et al., 2006).

En plus de son rôle dans la dimérisation, la région N-terminale des adaptateurs est décrite également, comme étant impliquée dans l'interaction et la régulation de leurs partenaires, notamment la kinase JAK2 pour SH2-B et APS ou le récepteur EPOR pour SH2-B (Javadi et al., 2012; Rui et al., 2000). D'autre part, les motifs riches en proline de la région N-terminale permettent leur interaction avec d'autres protéines contenant des domaines SH3. Ceci a été montré pour l'interaction de SH2-B et APS avec des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, telle que les protéines Rac-GTPase et Enigma, respectivement (Barres et al., 2005; Diakonova et al., 2002).

Enfin, il a été montré que les quatre isoformes de SH2-B possèdent une séquence de localisation nucléaire (NLS) leur permettant de migrer dans le noyau et une séquence d'export nucléaire (NES), leur permettant d'être localisée dans le cytoplasme (Chen and Carter-Su, 2004 ; Rui, 2014).

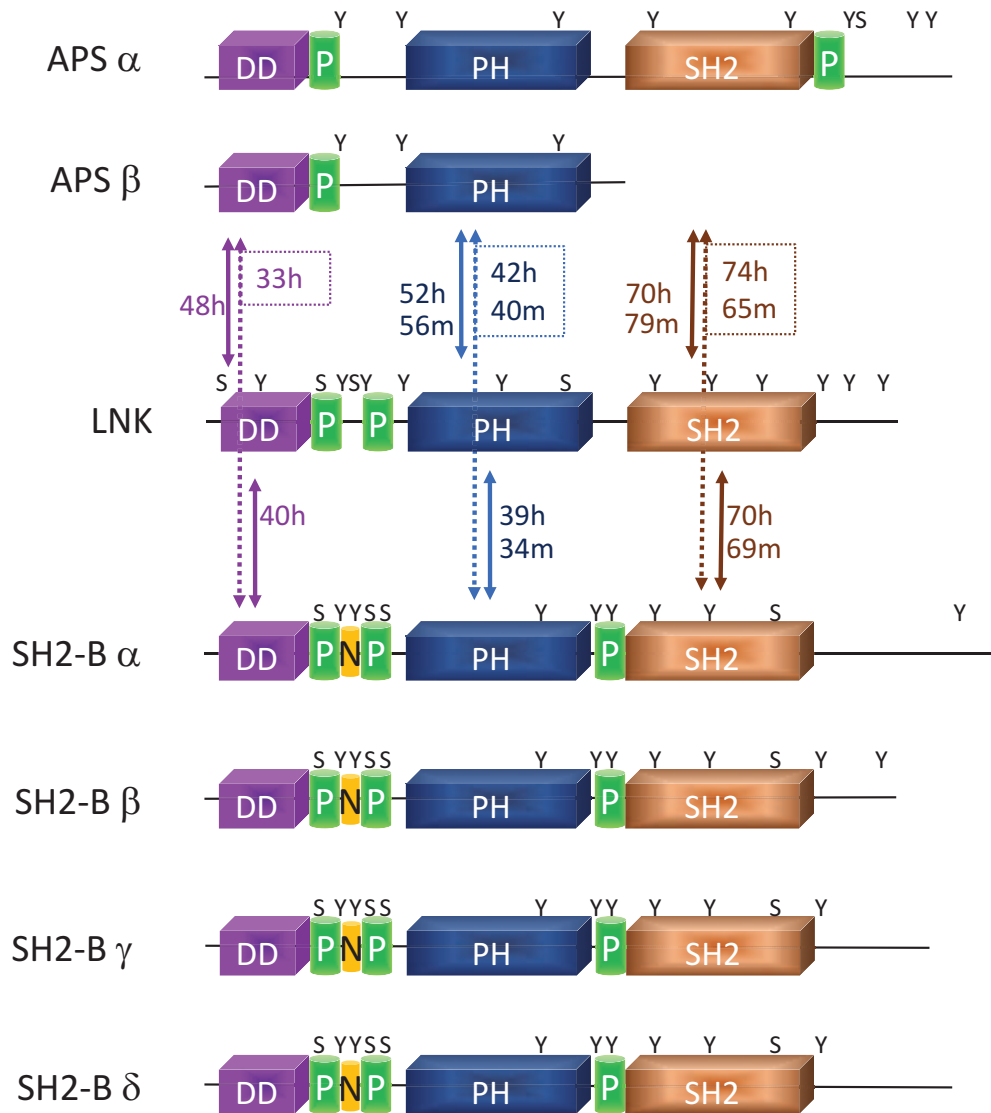


Figure 12 : Représentation schématique des protéines de la famille LNK

Les résidus sérine (S) et tyrosine (Y) sont représentés ; domaine de dimérisation (DD) ; motif riche en proline (P) ; les séquences NLS/NES (N). Les flèches accompagnées du chiffre représentent le pourcentage d'identité entre les domaines des différentes protéines, chez l'homme (h : human) et chez la souris (m : mouse). D'après Velazquez (Velazquez, 2012b) et Alignement de séquences réalisé par le site <http://www.uniprot.org/align/>

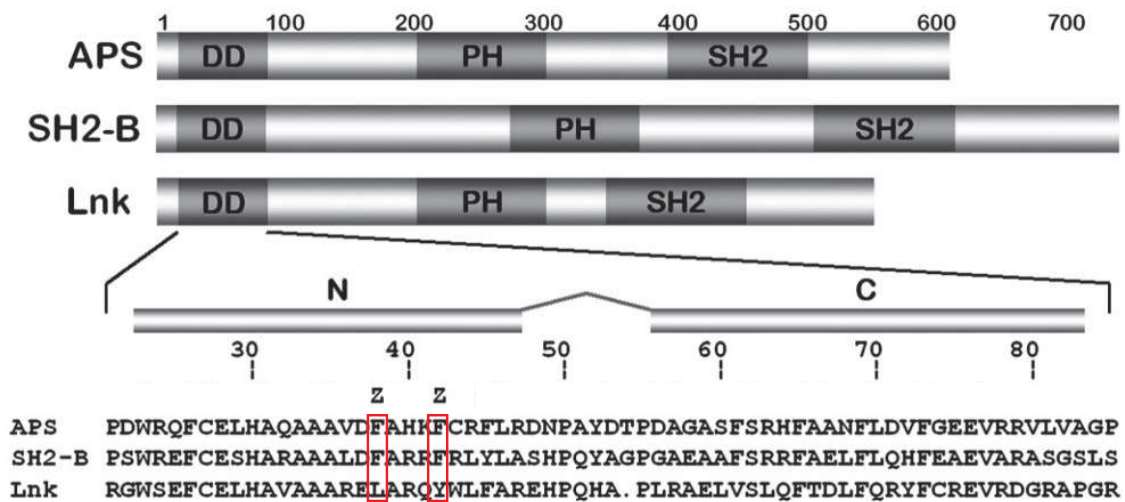


Figure 13 : Représentation schématique de la région N-terminale des protéines de la famille LNK et alignement des séquences du domaine de dimérisation

Structure basée sur le domaine de dimérisation (DD) de APS identifiée par Dhe-Paganon et collaborateurs. Rectangle rouge : phénylalanine 38 et 42 du motif « zipper » (Z) remplacé par une leucine et une tyrosine dans LNK. D'après Dhe-Paganon et collaborateurs (Dhe-Paganon et al., 2004)

B. Le domaine PH

Le domaine PH de ces protéines est constitué d'environ 120 acides aminés avec une homologie plus forte entre APS et SH2-B (Figure 12). La présence de ce domaine dans la structure de ces adaptateurs met en évidence l'importance de leur localisation subcellulaire au niveau de la membrane plasmique, favorisant leur association avec le complexe de signalisation afin d'exercer leur fonction. Ceci a d'abord été montré par des études sur des cellules HEK293T exprimant une forme de LNK délétée de son domaine PH dont la localisation est exclusivement cytoplasmique (Gery et al, 2007). D'autre part, des études utilisant des mutations ponctuelles (W191A ou W270A) dans le domaine PH de LNK ont montré l'importance de ce domaine dans la fonction inhibitrice de LNK pour la régulation des voies de signalisation activées par la TPO, l'EPO et le SCF, et dans la prolifération des progéniteurs mégacaryocytaires primaires (Baran-Marszak et al., 2010; Simon et al., 2008 ; Tong and Lodish, 2004 ; Tong et al., 2005). Par ailleurs, de nombreuses anomalies génétiques dans ce domaine ont été identifiées dans des hémopathies myéloïdes et lymphoïdes confirmant ainsi le rôle important de ce domaine dans la fonction régulatrice de LNK (Perez-Garcia et al., 2013; Velazquez, 2012b). Elles seront décrites dans le chapitre suivant et les résultats. Quant au domaine PH de APS, il est aussi impliqué dans l'association de l'adaptateur avec les facteurs d'échange de guanine (GEF) Vav3 et Vav1 dans des cellules NIH3T3 et lymphocytes B matures (Yabana and Shibuya, 2002) (Dondi et collaborateurs., manuscrit en préparation).

C. Le domaine SH2

Les protéines de la famille de LNK ont un domaine SH2, à l'exception d'APS β (Figure 12). Ce domaine d'environ 100 acides aminés est le principal domaine d'interaction avec leurs partenaires. De ce fait, il joue un rôle clé dans les fonctions biologiques de la famille LNK (Tableau 3). Des travaux ont montré que l'expression d'une forme de LNK avec un domaine SH2 inactif (LNK-R364M), abolit sa fonction inhibitrice. Cet effet a été démontré sur la prolifération et la migration des mastocytes dépendante du SCF, sur la différenciation et la survie activées par l'EPO dans le lignage érythrocytaire ainsi que sur la prolifération des progéniteurs primaires et cellules hématopoïétiques, stimulée par un cocktail de cytokines dont la TPO et le FL (Baran-Marszak et al., 2010 ; Lin et al., 2012 ; Simon et al., 2008 ; Tong and Lodish, 2004 ; Tong et al., 2005).

Bien que l'homologie des domaines SH2 parmi les trois membres soit relativement élevée (65-79 %), des études structurales et biochimiques ont révélé des différences importantes dans ce domaine qui déterminent leur spécificité et leur fonction. En effet, des études de cristallographie ont permis de mettre en évidence le mode de fonctionnement des domaines SH2 des protéines de la famille LNK. Le mode de fonctionnement classique des domaines SH2, appelé canonique, se fait sous forme monomérique. Dans ce mode, le domaine SH2

reconnait un résidu tyrosine phosphorylé suivi d'une séquence de 3 à 5 acides aminés, le plus souvent contenant un acide aminé hydrophobe en position +3, comme celle retrouvée autour de la Y813 (pYELL) de JAK2. La cristallographie du domaine SH2 de SH2-B associée à la kinase JAK2 a donc montré que le mode de fonctionnement de ce domaine est canonique (Hu and Hubbard, 2006). En revanche, la structure cristallisée du domaine SH2 de APS s'associant au domaine kinase du récepteur à l'insuline, a montré que ce domaine fonctionne sous forme d'un dimère (Hu et al., 2003). L'étude cristallographique du domaine SH2 de LNK n'a pas encore été réalisée. Cependant, la comparaison des séquences du domaine SH2 de SH2-B et LNK a suggéré que le domaine SH2 de LNK est monomérique comme celui de SH2-B puisqu'il ne dispose pas du résidu tryptophane en position 475, essentiel à la dimérisation du domaine SH2 de APS (Hu and Hubbard, 2006).

D. Les résidus tyrosine et sérine

La famille LNK possède plusieurs sites de phosphorylation sur des résidus tyrosine et sérine. La phosphorylation de ces résidus joue un rôle important dans la fonction régulatrice de ces adaptateurs, en servant de sites d'ancrage pour leurs effecteurs qui participent aux complexes inhibiteurs ou activateurs de la signalisation. Les membres de la famille LNK présentent dans leur région C-terminale un résidu tyrosine très conservé, ce qui suggère que ce site est important pour l'activité de ces protéines. Ce résidu correspond à la tyrosine 536 de LNK, qui est phosphorylé suite à son interaction avec le récepteur Kit, activé par le SCF dans les mastocytes (Takaki et al., 2002). Cependant, la mutation de ce résidu n'empêche pas la phosphorylation de LNK dans les mastocytes de la moelle osseuse, après l'activation du récepteur Kit, ce qui signifie que LNK possède d'autres sites de phosphorylation (Simon et al., 2008). Toutefois, il semblerait que la fonction dépendrait de la voie de signalisation activée. En effet, cette tyrosine est importante pour la prolifération des mastocytes et des érythroblastes, dépendante de l'IL-3 et l'EPO, tandis qu'elle ne semble pas être impliquée dans la régulation des voies de signalisation activées par la TPO dans les mégacaryocytes, ni par le SCF dans les mastocytes primaires (Simon et al., 2008 ; Tong and Lodish, 2004; Tong et al., 2005). Néanmoins, aucun partenaire de LNK s'associant à cette tyrosine n'a pas été identifié à ce jour.

En ce qui concerne APS, le résidu Y618 est phosphorylé par les récepteurs à l'insuline, à l'EPO et à l'antigène des cellules B (BCR) après leur activation, permettant l'interaction de l'adaptateur avec la E3 ligase Cbl (Moodie et al., 1999 ; Wakioka et al., 1999 ; Yokouchi et al., 1997). Ainsi, l'association APS/Cbl joue un rôle important dans l'ubiquitination, l'internalisation et la dégradation de ces récepteurs.

Les protéines de la famille LNK possèdent aussi des résidus sérine et thréonine qui phosphorylés, deviennent des sites d'ancrage pour certains de leurs partenaires. La phosphorylation de LNK sur des résidus sérine a été identifiée par deux études indépendantes. D'abord, Jiang et son équipe, a montré que sur les résidus sérine S13 et S129 situés dans la région N-terminale de LNK, sont respectivement phosphorylés par la kinase glycogène synthase

3 (GSK3) et la protéine kinase A (PKA) dans la lignée cellulaire 32D (Jiang et al., 2012). Ces résidus phosphorylés servent, ensuite, de sites de liaison aux protéines 14-3-3. Ces protéines jouent un rôle important dans plusieurs processus biologiques, incluant la régulation du cycle cellulaire, la transduction du signal, le contrôle du métabolisme, l'apoptose et le contrôle de la transcription de gènes. Leur interaction avec leurs partenaires se fait via des résidus sérine et thréonine phosphorylés (Morrison, 2009). L'interaction entre LNK et 14-3-3 joue un rôle dans la modulation de l'activité régulatrice de LNK dans la voie de TPO, en bloquant l'adaptateur dans le cytoplasme, loin du complexe de signalisation. D'autre part, ces mêmes résidus sérine phosphorylés de LNK ont été également identifiées dans des lignées cellulaires humaines de cancer ovarien surexprimant LNK, où il semblerait avoir un rôle de régulateur positif (Ding et al., 2015).

Par ailleurs, APS est phosphorylé sur le résidu S588 présent dans sa région C-terminale par la kinase AKT, après stimulation par l'insuline. Cette phosphorylation est impliquée dans la régulation de la localisation cellulaire de l'adaptateur (Katsanakis and Pillay, 2005).

Quant à l'adaptateur SH2-B, il peut être aussi phosphorylé sur plusieurs résidus sérine et thréonine par la kinase MEK, ou une protéine en aval, tel que le résidu S96, en réponse à une stimulation par le NGF (Rui et al., 1999b). De plus, la phosphorylation des S161 et S165 proche de la séquence NLS permet la translocation de l'adaptateur dans le noyau, dépendante du NGF (Maures et al., 2009).

Ainsi, bien que leur structure soit très homologue leur conférant des fonctions communes, le fait que les adaptateurs de la famille LNK ne soient pas phosphorylés sur les mêmes résidus, et qu'ils n'utilisent pas le même mode de fonctionnement au niveau des domaines de dimérisation et SH2, laisse envisager des fonctions spécifiques pour chaque membre et chaque isoforme de cette famille.

III. Rôle fonctionnel des protéines de la famille LNK

Des souris déficientes pour chacune de ces protéines ont été générées, afin de définir le rôle fonctionnel des protéines adaptatrices de la famille LNK, dans les différents systèmes cellulaires dans lesquelles elles sont exprimées et de confirmer ainsi leur signification biologique (Tableau 4).

Les souris *Lnk*^{-/-} présentent, dès leur naissance, des dérégulations du système hématopoïétique. Elles ont une splénomégalie due à l'augmentation de trois lignages hématopoïétiques : les cellules progénitrices B et érythrocytes causent un changement dans l'architecture de la rate, et une augmentation du nombre de mégacaryocytes probablement responsable de la fibrose observée dans la rate de ces souris. Ces anomalies sont dues à une hypersensibilité des cellules aux cytokines, telles que, la TPO, l'EPO, l'IL-7, l'IL-3 et le SCF provoquant une augmentation du nombre de cellules souches et progéniteurs

hématopoïétiques de ces lignées, ainsi qu'une hématopoïèse extramédullaire (Takaki et al., 2000 ; Velazquez et al., 2002). Néanmoins, les souris *Lnk*^{-/-} ne présentent pas d'anomalies des cellules T, ni du thymus ou des autres organes et tissus analysés, bien que la protéine ait été décrite initialement comme étant impliquée dans l'activation des lymphocytes T (Huang et al., 1995). Ces données suggèrent que LNK est un régulateur important des voies de signalisation activées par ces cytokines, lui permettant de réguler la prolifération de plusieurs lignages hématopoïétiques.

Quant aux souris déficientes en APS, elles sont viables, fertiles et présentent également un phénotype hématopoïétique anormal avec l'augmentation du nombre de cellules B-1, une sous-population de lymphocytes B présente dans la cavité péritonéale et pleurale, très sensible à la signalisation du BCR. Elles présentent aussi une augmentation de la réponse immune stimulée par des antigènes thymus-indépendants du type 2 (TI-2) (Iseki et al., 2004). Ces résultats indiquent donc que APS joue un rôle de régulateur négatif dans le développement et/ou la prolifération des cellules B matures en contrôlant la signalisation du BCR. Néanmoins, le mécanisme moléculaire impliquant APS dans cette voie n'est pas clairement défini. Par ailleurs, les souris *APS*^{-/-} ont également une intolérance au glucose avec une sensibilité élevée à l'insuline. Ce phénotype a confirmé le rôle de régulateur négatif d'APS dans la signalisation du récepteur à l'insuline (Minami et al., 2003).

Contrairement aux souris *Lnk*^{-/-} et *APS*^{-/-}, les souris déficientes en SH2-B ne présentent pas d'anomalies du système hématopoïétique. Elles ont indépendamment été générées par deux groupes et présentent deux phénotypes très différents. Les souris du premier groupe présentent un retard de croissance, de développement et une insuffisance de la maturation des tissus gonadiques. En effet, ces souris ont de petits ovaires ne permettant pas l'ovulation et de petits testicules causant une diminution de la production du sperme, elles ne sont donc pas fertiles (Ohtsuka et al., 2002). Le deuxième groupe a généré des souris caractérisées par une résistance à l'insuline, une intolérance au glucose et une sensibilité à la leptine causant une obésité morbide due à la perte d'activation de JAK2 (Duan et al., 2004).

Tableau 4 : Phénotype des souris déficientes en SH2-B, APS et LNK

<i>Souris déficientes pour la protéine</i>	<i>Phénotype</i>
LNK	Augmentation des progéniteurs pré-B, érythrocytes, mégacaryocytes, et des progéniteurs et cellules matures endothéliales Splénomégalie avec fibrose Hypersensibilité aux cytokines Hématopoïèse extramedullaire
APS	Augmentation des lymphocyte B-1 Augmentation de la réponse immunitaire stimulé par TI-2 Intolérance au glucose Sensibilité à la leptine
SH2-B	Retard de croissance et du développement Insuffisance de maturation des tissus gonadiques Stérile Résistance à l'insuline Intolérance au glucose Sensibilité à la leptine Obésité morbide

A. Rôle dans le système hématopoïétique

1. Régulation des voies de signalisation induites par les récepteurs aux cytokines

Les membres de la famille LNK ont tous été identifiés dans les cellules du système immunitaire : les cellules T pour LNK, les cellules B pour APS et les mastocytes pour SH2-B. Cependant, seules LNK et APS ont été confirmées comme ayant un rôle dans le système hématopoïétique, grâce à la génération des souris déficientes pour ces protéines. Les rôles fonctionnels des protéines adaptatrices de la famille LNK dans le système hématopoïétique, sont répertoriés dans le tableau 5, en détaillant leur partenaire et leur site d'interaction.

a. La voie de signalisation TPO/MPL

Une des deux principales voies de signalisation dont LNK s'est avéré être un régulateur négatif clé, est la voie de la TPO et son récepteur MPL. Comme mentionné auparavant, cette cytokine est cruciale pour le développement et la prolifération des HSC, des progéniteurs myéloïdes et le lignage mégacaryocytaire (mégacaryocytes et plaquettes). De manière intéressante, les souris déficientes en LNK présentent des anomalies dans ces lignées cellulaires, ce qui a réaffirmé le rôle inhibiteur de LNK dans la voie de signalisation TPO/MPL.

Grâce à des études sur des HSC dérivées de souris *Lnk*^{-/-}, plusieurs équipes ont démontré que LNK régule l'auto-renouvellement, la quiescence, la prolifération et l'apoptose de ces cellules via la voie de signalisation stimulée par la TPO. En effet, l'absence de LNK entraîne l'augmentation du nombre de HSC et leur capacité à reconstituer le système hématopoïétique dans des souris irradiées comparé aux HSC normales (Ema et al., 2005 ; Seita et al., 2007 ; Takaki et al., 2002). De plus, les HSC *Lnk*^{-/-} présentent une sensibilité accrue à la TPO, résultant en l'activation anormale des voies JAK2/STAT5, AKT et de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL, tout en inhibant la voie p38MAPK (Bersenev et al., 2008 ; Buza-Vidas et al., 2006 ; Ema et al., 2005 ; Seita et al., 2007 ; Suzuki et al., 2012).

En ce qui concerne le lignage mégacaryocytaire, il a été montré que LNK exerce sa fonction inhibitrice tout au long de cette lignée (Velazquez et al., 2002), en régulant les voies JAK/STAT, MAPK et AKT activées par la TPO et par l'intermédiaire de ses domaines SH2 et PH (Baran-Marszak et al., 2010; Tong and Lodish, 2004). De plus, il a été montré que la voie TPO/MPL/JAK2 induit l'expression de LNK, entraînant la rétro-régulation négative de cette voie (TPO/MPL/JAK2/LNK) (Baran-Marszak et al., 2010).

Au niveau moléculaire, suite à la stimulation par la TPO, LNK s'associe à la kinase et au récepteur MPL activés. L'interaction entre le domaine SH2 de LNK et les résidus Y813 et Y613 présents dans le domaine pseudokinase de JAK2, induit la phosphorylation de l'adaptateur par la kinase. Toutefois, cette interaction se fait majoritairement via la Y813 (Bersenev et al., 2008).

En outre, comme mentionné dans la section II-D de ce chapitre, l'interaction LNK/JAK2 est régulée par la protéine 14-3-3 qui retient l'adaptateur dans le cytoplasme, inhibant le complexe LNK/JAK2 et par conséquent, l'activation de la kinase (Figure 14). En ce qui concerne l'interaction entre LNK et le récepteur MPL, les sites impliqués n'ont pas été définis à ce jour.

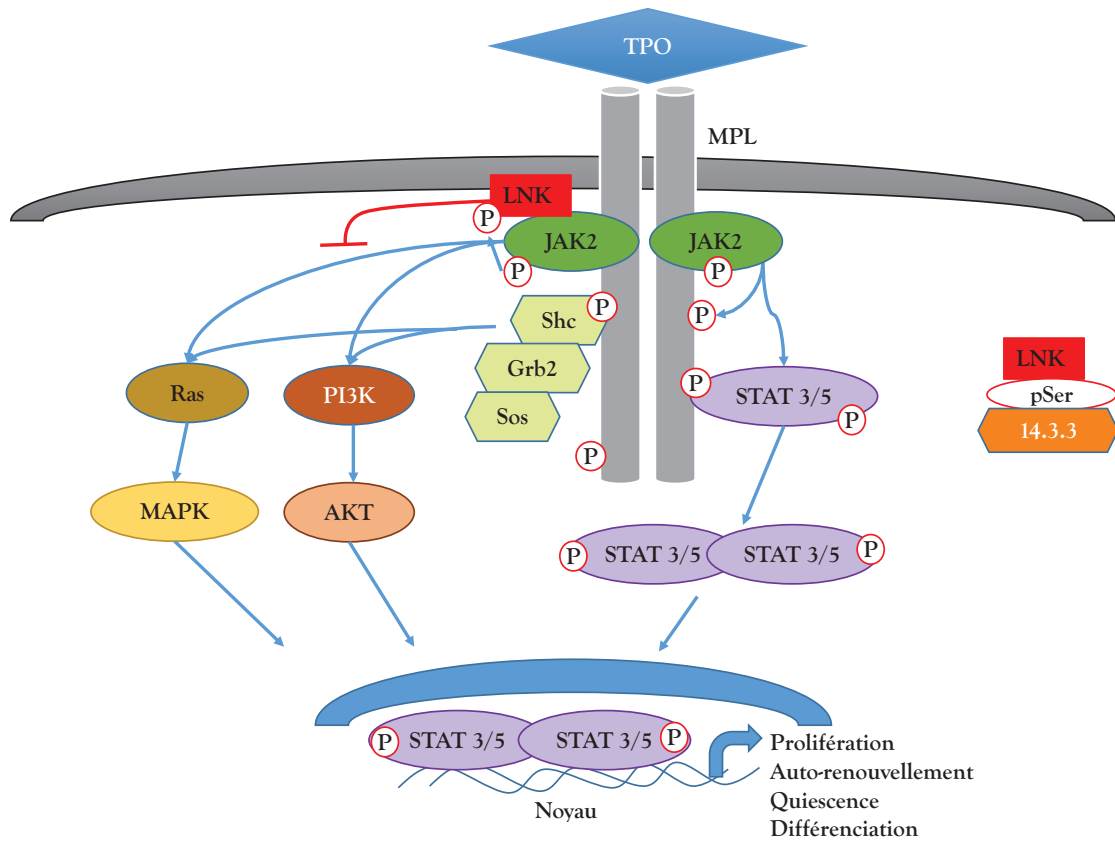


Figure 14 : Rôle de LNK dans la voie de signalisation TPO/MPL

La fixation de la TPO sur le récepteur MPL permet l'autophosphorylation des kinases JAK2. Ceci induit la phosphorylation de plusieurs molécules de signalisation et ainsi l'activation de plusieurs voies (flèches bleues) afin d'induire une réponse biologique. Ces voies sont inhibées par LNK directement (traits rouges). 14.3.3 se lie à LNK afin d'empêcher sa fonction. La phosphorylation des résidus tyrosine ou sérine est respectivement représentée par un P entourés en rouge ou pSer.

b. La voie de signalisation EPO/EPOR

La principale voie de signalisation régulant l'érythropoïèse est celle de l'EPO et son récepteur EPOR. Elle inhibe l'apoptose des progéniteurs érythroïdes et favorise leur prolifération. De manière intéressante, cette voie de signalisation est la seule connue à ce jour dont l'activation est contrôlée par les trois membres de la famille LNK.

En ce qui concerne l'adaptateur LNK, son rôle dans l'érythropoïèse a été mis en évidence, grâce à l'analyse du phénotype des animaux *Lnk*^{-/-}. En effet, ces souris présentent une hyperprolifération des progéniteurs érythrocytaires (BFU-E et CFU-E) dans la moelle osseuse et la rate, due à leur hypersensibilité à l'EPO (Tong et al., 2005; Velazquez et al., 2002). Cependant, leur hématocrite est normal, mais leur réponse à l'érythropoïèse de stress est plus importante que celle présente dans des souris contrôles.

Au niveau cellulaire, des études sur la lignée 32D exprimant l'EPOR et LNK, ont montré que cet adaptateur inhibe la signalisation du récepteur (Tong et al., 2005). Cette inhibition se traduit par une diminution de l'activation des principales voies activées par l'EPO : JAK2/STAT5, MAPK et AKT, ce qui a pour conséquence l'inhibition de l'érythropoïèse. En revanche, la surexpression de LNK dans les cellules érythroïdes primaires entraîne l'apoptose massive et l'inhibition de la différenciation terminale de ces cellules induites par l'EPO (Tong et al., 2005). D'autre part, l'expression des formes mutées sur les différents domaines de LNK dans des érythroblastes primaires, a montré que le domaine SH2 est indispensable pour la régulation de la signalisation de l'EPOR. Par contre, le domaine PH et le résidu tyrosine conservé en C-terminal ne semblent pas jouer un rôle important dans cette voie.

L'étude du mécanisme d'action de LNK a montré qu'après la stimulation par l'EPO, LNK s'associe au complexe de signalisation, probablement via JAK2, induisant sa phosphorylation par la kinase. Une fois phosphorylé, l'adaptateur inhibe l'activation de JAK2, et en conséquence, celle de l'EPOR et des voies de signalisation en aval, incluant STAT5, AKT et MAPK (Figure 15). Ces données ont ainsi montré que LNK régule l'érythropoïèse via l'inhibition de la voie EPO/EPOR/JAK2.

Comme mentionné précédemment, l'hématocrite des souris *Lnk*^{-/-} est normal. Il est donc possible que ceci soit lié à un mécanisme compensatoire exercé par les autres membres de la famille LNK décrits également comme des partenaires du récepteur EPOR.

En effet, des études de surexpression de la protéine APS dans les lignées cellulaires HEK293T et BaF3 exprimant l'EPOR, ont montré que APS s'associe via son domaine SH2 au résidu Y343 phosphorylé du récepteur, site de fixation de STAT5, suggérant ainsi qu'un des mécanismes d'inhibition de STAT5 par APS implique le blocage de sa liaison au récepteur EPOR. De plus, cette association de l'adaptateur au récepteur conduit à sa phosphorylation par la kinase JAK2 au niveau de son résidu Y618 en C-terminal, qui permet ensuite la liaison de APS avec la E3 ligase Cbl (Wakioka et al., 1999). L'interaction APS/Cbl joue alors un rôle dans

la régulation de la signalisation de l'EPO, probablement par l'internalisation et la dégradation du complexe de signalisation EPOR/JAK2 (Figure 15).

Quant à SH2-B, des travaux à partir de lignées cellulaires et des érythroblastes primaires ont montré que cet adaptateur s'associe au récepteur EPOR par l'intermédiaire de deux de ses domaines. SH2-B via sa région N-terminale s'associe de façon constitutive au récepteur. Cette liaison augmente la concentration de SH2-B autour de l'EPOR, favorisant par la suite l'interaction rapide de l'adaptateur, via son domaine SH2 avec les résidus Y343 et/ou Y401 phosphorylés de l'EPOR activé (Javadi et al., 2012) (Figure 15). La stimulation par l'EPO entraîne la phosphorylation de l'adaptateur, probablement au niveau de ses résidus sérine et thréonine. D'autre part, l'inhibition de l'expression de SH2-B par des expériences de siRNA a montré l'augmentation de l'activation des voies de signalisation en aval de l'EPOR, JAK2/STAT5 et MAPK, confirmant ainsi un rôle inhibiteur de SH2-B dans la signalisation de l'EPO, comme démontré pour APS et LNK.

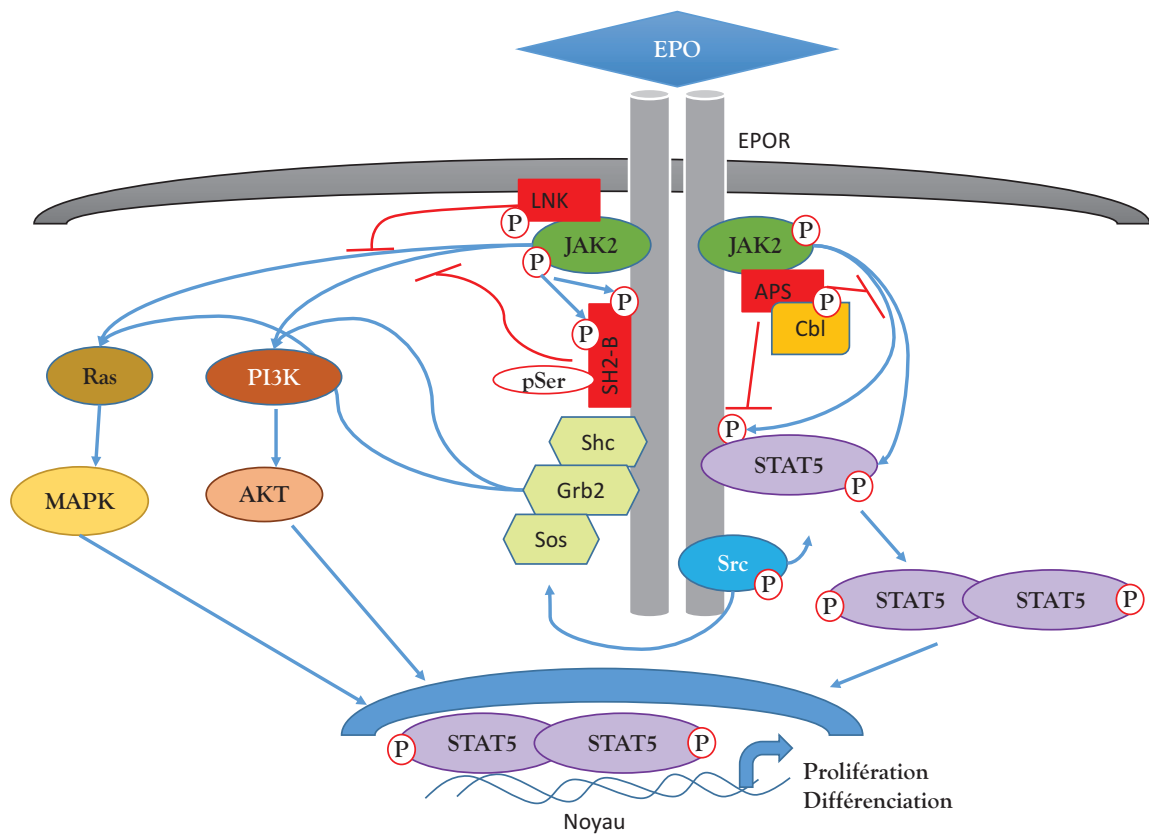


Figure 15 : Rôle des protéines adaptatrices de la famille LNK sur la voie de signalisation EPO/EPOR

La fixation de l'EPO sur le récepteur EPOR permet la phosphorylation des kinases JAK2 et Src. Ceci induit la phosphorylation de plusieurs molécules de signalisation et ainsi l'activation de plusieurs voies (flèches bleues) afin d'induire une réponse biologique. Ces voies sont inhibées par LNK, SH2-B ou APS qui peut se lier à Cbl (traits rouges). La phosphorylation des résidus tyrosine ou sérine est respectivement représentée par un P entourés en rouge ou pSer.

c. La voie de signalisation IL-7/IL-7R

Une des cytokines les plus importantes pour la régulation de la lignée lymphoïde est l'IL-7. L'analyse des souris *Lnk*^{-/-} a mis en évidence l'expansion sélective dans la moelle osseuse et dans la rate de lymphocytes pro/pré-B et B immatures due principalement à leur sensibilité accrue à l'IL-7, mais également au SCF, démontré par des essais de prolifération de cellules pré-B co-stimulées par ces cytokines (Simon et al., 2008; Takaki et al., 2002 ; Velazquez et al., 2002). Ceci suggère l'implication de LNK dans le contrôle de la signalisation de l'IL-7, essentielle dans les premières étapes du développement des cellules B.

Dans ce contexte, les travaux effectués dans notre laboratoire ont montré une augmentation du nombre des cellules exprimant le récepteur à IL-7R dans les souris *Lnk*^{-/-}, ce qui pourrait expliquer partiellement l'augmentation de la prolifération en présence d'IL-7 dans ces animaux. En revanche, la surexpression de LNK dans une lignée pré-B dépendante de l'IL-7 inhibe la prolifération de ces cellules. Cette fonction nécessite, une fois de plus, le domaine SH2 de l'adaptateur. Par ailleurs, cette inhibition est spécifique à LNK car la surexpression de la protéine APS dans des cellules pré-B n'est pas capable d'inhiber la croissance de ces cellules (Dondi et collaborateurs., manuscrit en préparation). Ainsi, ces résultats montrent que LNK est un régulateur important de la prolifération dépendante de l'IL-7 via son domaine SH2.

Enfin, l'analyse des complexes de signalisation où LNK est impliqué, a montré que l'adaptateur est phosphorylé après stimulation par l'IL-7, ce qui lui permet de s'associer à la kinase JAK3 activée par cette cytokine et d'inhiber la voie JAK3/STAT5 (Cheng et al., 2016). De plus, LNK est également capable d'interagir avec la ligase E3 Cbl, lors de la stimulation des progéniteurs B par l'IL-7. Cette association favorise le rapprochement de la ligase au complexe de signalisation, ce qui résulte en la phosphorylation de Cbl possiblement par les kinases JAK (Dondi et collaborateurs., manuscrit en préparation). Ces résultats suggèrent que LNK régule la réponse à cette cytokine en se servant de l'activité d'ubiquitination de son partenaire Cbl pour la dégradation du complexe de signalisation (Figure 16).

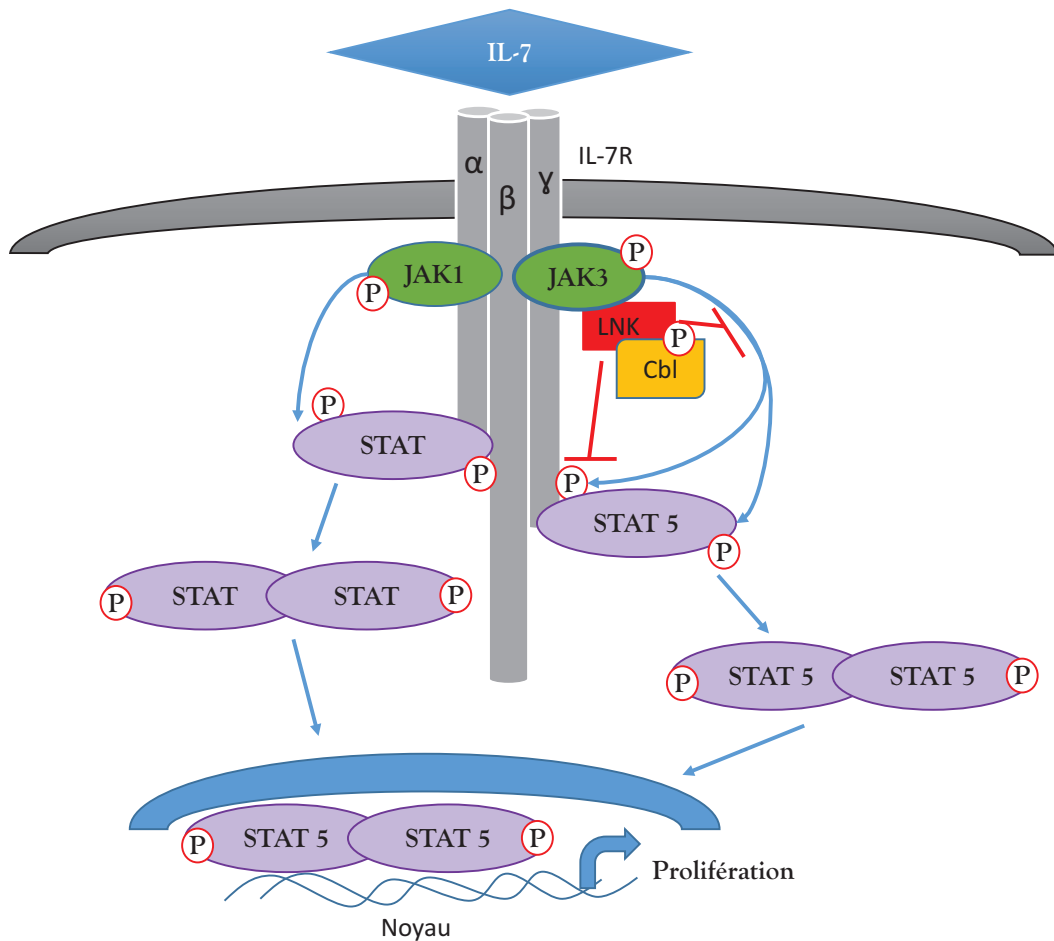


Figure 16 : Rôle de LNK dans la voie de signalisation IL-7/IL-7R

La fixation de l'IL-7 sur son récepteur permet la phosphorylation des kinases JAK3 et JAK1, et des facteurs de transcription STAT (flèches bleues) afin d'induire une réponse biologique. Ces voies sont inhibées par LNK qui peut se lier à Cbl (traits rouges). La phosphorylation des résidus tyrosine ou sérine est respectivement représentée par un P entourés en rouge ou pSer.

2. Régulation des voies de signalisation induites par les RTK

Les protéines adaptatrices de la famille LNK sont également impliquées dans la régulation des voies de signalisation activées par des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase (RTK), notamment ceux appartenant à la famille de RTK de type III. Cette famille comprend les récepteurs au SCF (Kit), au FLT3 Ligand (FLT3), au PDGF (PDGFR α et PDGFR β), ainsi qu'au M-CSF (c-Fms). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'une région juxtamembranaire (JM) dans leur domaine cytoplasmique, important pour la modulation des fonctions du récepteur et d'une insertion kinase qui divise en deux le domaine kinase.

L'activation des RTK de cette famille requiert l'induction de leur activité kinase intrinsèque et la création de sites d'ancrage pour différentes molécules de signalisation. La liaison du ligand sur le RTK induit la dimérisation de récepteur et ainsi son autophosphorylation sur des résidus tyrosine dans les domaines kinase. L'activation de la kinase permet ensuite la phosphorylation de résidus tyrosine dans la région régulatrice JM et de la partie C-terminale, générant ainsi des sites d'ancrage pour différentes molécules de signalisation contenant des domaines SH2.

Le rôle des adaptateurs de la famille LNK dans les voies de signalisation activées par les RTK, sera détaillé en prenant comme exemple le récepteur Kit, du fait de son importance dans les cellules hématopoïétiques, et des connaissances acquises sur la fonction de ces adaptateurs dans cette voie de signalisation à ce jour.

Les progéniteurs hématopoïétiques *Lnk*^{-/-} sont hypersensibles au SCF, dont les progéniteurs B (Takaki et al., 2002; Velazquez et al., 2002). Ce phénotype suggère l'implication de LNK dans la régulation de la voie de SCF/Kit, qui a été confirmé par des expériences de reconstitution chez la souris. En effet, l'équipe de Takaki a montré que des souris *Lnk*^{-/-} greffées par des cellules médullaires issues des souris hétérozygotes pour la mutation *Kit*^W, altérant l'expression du récepteur à la surface cellulaire, présente une normalisation partielle mais significative du nombre de progéniteurs hématopoïétiques. Ceci montre que LNK régule l'hématopoïèse précoce, en partie, via le contrôle de la signalisation dépendante du SCF/Kit (Takaki et al., 2002).

LNK joue aussi un rôle important dans les cellules mastocytaires. Ceci n'est pas surprenant étant donné que la voie de SCF/Kit est indispensable pour plusieurs réponses biologiques de ces cellules. Dans ce contexte, des études sur des mastocytes *Lnk*^{-/-} a démontré le rôle physiologique de cet adaptateur dans les voies de signalisation dépendantes du SCF contrôlant la prolifération (via MAPK et JNK) et la migration (via Rac et p38MAPK). Ces fonctions sont principalement contrôlées par le domaine SH2 de LNK. En effet, des études menées par notre équipe et d'autres groupes ont mis en évidence dans des mastocytes primaires et la lignée mastocytaire MC9 que l'interaction LNK/Kit implique le domaine SH2 de LNK et les résidus Y568 et Y569 phosphorylés présents au niveau du domaine JM de Kit. Cette interaction aboutit à la phosphorylation de LNK et à la modulation des voies de signalisation activées par SCF contrôlant la prolifération et la migration de cellules mastocytaires (Gueller et al., 2008; Simon

et al., 2008). Sachant que la région JM de Kit est essentielle pour le recrutement des molécules activatrices de la signalisation du récepteur, ceci a permis de proposer un modèle d'action de LNK dans lequel la fixation de l'adaptateur au niveau du domaine JM bloque la liaison de ces activateurs, entraînant ainsi en l'inhibition des voies de signalisation en aval du récepteur Kit. Dans cette optique, le travail de l'équipe de Takaki a démontré que la liaison entre LNK et Kit empêche la phosphorylation de l'adaptateur positif Gab2 et par conséquent, l'activation de la cascade de signalisation de la voie MAPK impliquée dans la prolifération cellulaire (Takaki et al., 2002) (Figure 17).

En ce qui concerne l'adaptateur APS, il a été identifié par des expériences de double hybride comme un substrat du récepteur Kit (Yokouchi et al., 1997). De ce fait, l'équipe de Yokouchi a examiné le rôle de cette protéine sur la voie de signalisation de SCF/Kit dans des lignées humaines B matures Daudi et Raji, ainsi que dans les cellules HEK293T. Ils ont ainsi mis en évidence que l'adaptateur APS est phosphorylé par le récepteur Kit, notamment sur le résidu Y618 en C-terminal. Plus tard, il a été montré par des expériences de co-transfections dans des cellules COS7 et des peptides synthétiques dérivés du récepteur Kit, que l'adaptateur APS s'associe via son domaine SH2 au niveau des résidus Y567 et Y934 phosphorylés de Kit (Wollberg et al., 2003). Cette différence entre LNK et APS dans le site de liaison sur Kit, est probablement liée à la spécificité propre du domaine SH2 de chacune de ces deux protéines, mise en évidence précédemment par des études cristallographiques. Par contre, à la différence de LNK, les effets fonctionnels de l'interaction APS/Kit n'ont pas encore été déterminés.

De manière intéressante, le résidu Y568, site d'interaction de LNK avec le récepteur Kit, est conservé entre les membres de la famille des RTK de type III, suggérant que LNK pourrait s'associer et réguler également d'autres récepteurs de cette famille. En effet, plusieurs équipes ont montré que LNK est capable de se lier via son domaine SH2, aux résidus tyrosine phosphorylés localisés dans la région JM et C-terminale des récepteurs FLT3 (Y572, Y591 et Y919), c-Fms et PDGFR (PDGFR α et PDGFR β). Ceci a été démontré en utilisant des cellules hématopoïétiques primaires dérivées de souris *Lnk*^{-/-} (progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes) et/ou des lignées cellulaires hématopoïétiques (32D, BaF3 et RAW 264.7) ou autres (HEK293T), exprimant toutes le récepteur RTK spécifique, selon l'étude. Dans tous les systèmes étudiés, LNK module négativement les voies de signalisation MAPK et AKT en aval des RTK, inhibant ainsi la prolifération, la survie et la migration cellulaire (Gueller et al., 2010 ; Gueller et al., 2011; Lin et al., 2012).

Dans le cas de la voie M-CSF/c-Fms, il a été montré que LNK joue également un rôle important dans la production de « Reactive Oxygen Species » (ROS) par les macrophages, ce qui implique l'adaptateur dans l'immunité innée via la régulation des fonctions biologiques des macrophages (Gueller et al., 2010).

D'autre part, des études ont montré que SH2-B et APS sont également impliqués dans la signalisation du récepteur au PDGF β de cellules non-hématopoïétiques. Dans des fibroblastes NIH 3T3, ces adaptateurs s'associent par leur domaine SH2 au récepteur après stimulation par

le PDGF. Cette association induit alors la phosphorylation de SH2-B sur des résidus sérine, thréonine et tyrosine, lui conférant ainsi la capacité de stimuler la mitose, induite en réponse au PDGF (O'Brien et al., 2002 ; Rui and Carter-Su, 1998 ; Yousaf et al., 2001). En revanche, l'association de APS avec PDGF β entraîne sa phosphorylation sur des résidus tyrosine et son interaction avec Cbl, ce qui inhibe la mitose induite par le PDGF, probablement en favorisant la dégradation du récepteur (Yokouchi et al., 1999).

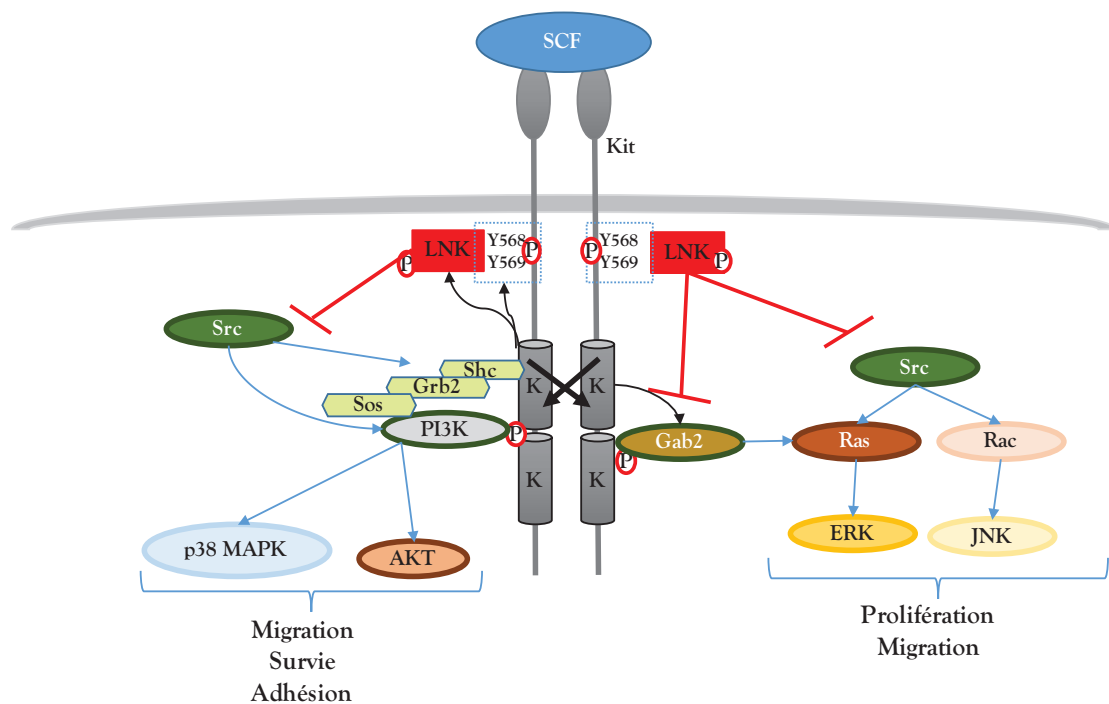


Figure 17 : Rôle de LNK dans la voie de signalisation SCF/Kit

La fixation du SCF sur son récepteur Kit permet la transphosphorylation de ces monomères. Ceci induit la phosphorylation de plusieurs molécules de signalisation et ainsi l'activation de plusieurs voies (flèches noires et bleues) afin d'induire une réponse biologique. Ces voies sont inhibées par LNK qui se lie au Y568/569 de Kit (traits rouges). La phosphorylation des résidus tyrosine est représentée par un P entourés en rouge.

3. La voie de signalisation des intégrines

Les intégrines jouent un rôle important dans la motilité des cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques vers des microenvironnements spécialisés ou niches dans la moelle osseuse, ainsi que leur adhésion via « Vascular Cell Adhesion Molécule-1 » (VCAM-1) et ses récepteurs, les intégrines « very-late antigen-4, aussi appelées $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 4\beta 7$ » (VLA-4). En particulier, les intégrines sont impliquées dans la libération des proplaquettes par les mégacaryocytes. L'adhésion des mégacaryocytes aux cellules endothéliales (EC) des vaisseaux sanguins par VCAM-1 (exprimée sur les EC), stimule leur maturation dans la moelle osseuse et la libération des plaquettes dans le sang périphérique. Dans ce contexte, l'équipe de Takizawa a montré que la co-stimulation par la TPO et VCAM-1 des mégacaryocytes *Lnk*^{-/-}, entraîne une augmentation du nombre et de la taille de ces cellules, ce qui résulte en la libération retardée d'un grand nombre de plaquettes comparées aux mégacaryocytes WT. Ceci est due à l'activation continue de STAT5 en l'absence de LNK (Figure 18A). Ainsi, ces résultats montrent que LNK contrôle la thrombopoïèse et la motilité des mégacaryocytes en régulant de façon croisée les voies de signalisation activées par les cytokines et les intégrines (Takizawa et al., 2008).

D'autre part, l'adaptateur LNK a été décrit comme un inhibiteur des voies de signalisation des cytokines, impliquées dans les réponses biologiques des cellules hématopoïétiques étudiées à ce jour. Néanmoins, LNK semble jouer un rôle activateur dans l'agrégation plaquettaire. Lors d'une blessure, les plaquettes sont recrutées et adhèrent à la lésion, via l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$, où elles s'agrègent et secrètent des facteurs nécessaires pour l'arrêt de l'hémorragie. Ainsi, l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ est indispensable à l'adhésion, à l'étalement et à l'agrégation des plaquettes lors de l'hémostase. La fixation du fibrinogène sur l'intégrine induit l'activation des différentes kinases, telles que Syk, Src et Fyn, suivi par la phosphorylation du récepteur par cette dernière, au niveau de sa région cytoplasmique. De ce fait, l'activation de l'intégrine conduit à la réorganisation du cytosquelette d'actine et l'adhésion des plaquettes, facilitant ainsi la stabilité du caillot plaquettaire formé ou thrombus.

En utilisant des techniques d'imagerie *in vivo* sur des souris *Lnk*^{-/-}, l'équipe de Takizawa a montré que LNK stimule la stabilisation du thrombus via l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ (Takizawa et al., 2010). En effet, les plaquettes *Lnk*^{-/-} adhèrent moins en réponse au fibrinogène, ce qui se traduit au niveau moléculaire en une diminution de la phosphorylation de la sous-unité $\beta 3$ du récepteur due à un défaut dans l'association de la kinase Fyn à l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$. Ces modifications altèrent la stabilisation du thrombus. Ainsi, cette étude propose un modèle où l'activation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ par du fibrogène, induit l'activation des kinases Src et Syk. Ces protéines vont ensuite phosphoryler LNK qui à son tour, va renforcer l'interaction de Fyn avec l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ et sa phosphorylation afin de stimuler l'adhésion des plaquettes et la réorganisation de leur cytosquelette. De ce fait, LNK régule positivement la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha IIb\beta 3$ dans les plaquettes (Figure 18B).

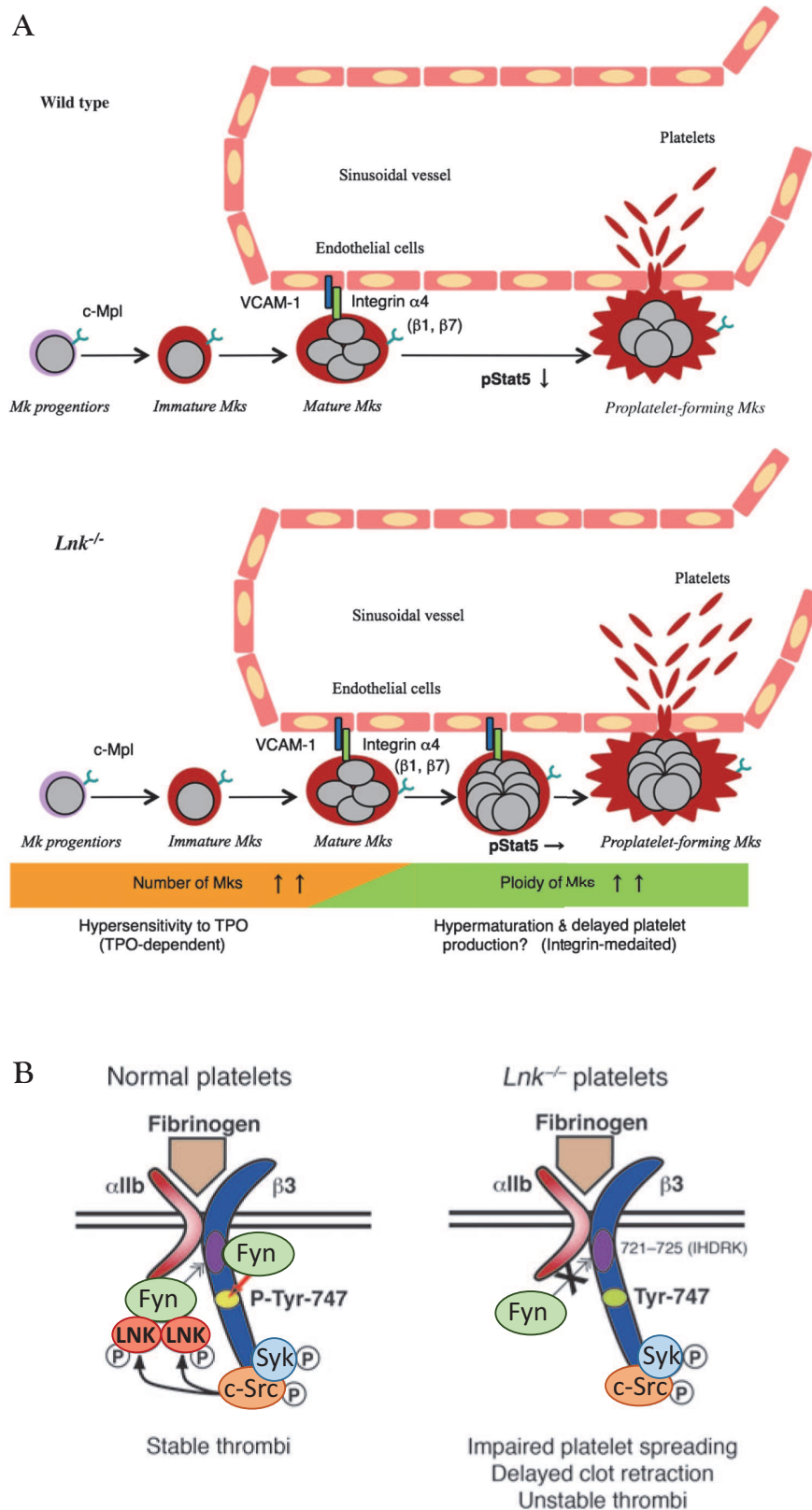


Figure 18 : Modèle d'action de LNK via les intégrines

A) Modèle d'action de LNK dans la libération des proplaquettes B) Mode d'action LNK dans la stabilisation du thrombus. Mk : mégacaryocyte D'après Takizawa et collaborateurs (Takizawa et al., 2008 ; Takizawa et al., 2010).

4. Les voies de signalisation des récepteurs à l'antigène (BCR et TCR)

L'analyse des souris *Lnk*^{-/-} a mis en évidence l'expansion sélective de lymphocytes pro/pré-B et B immatures dans ces animaux. Toutefois, aucun effet sur les cellules B matures n'a été observé en l'absence de LNK, suggérant soit aucune fonction de LNK sur cette population soit une compensation fonctionnelle par APS dans ces cellules.

En effet, l'expression de l'adaptateur APS a été principalement détectée dans des cellules B matures, avec une expression plus faible dans les cellules immatures et indétectable dans de progéniteurs pro/pré-B (Yokouchi et al., 1997) (Dondi et collaborateurs., manuscrit en préparation). Dans les cellules B matures, il a été démontré que APS joue un rôle dans le développement et la fonction de ces cellules B, comme en témoignent les animaux déficients pour APS. L'ablation de APS chez la souris provoque une augmentation du nombre de cellules de la sous-population B-1 et une meilleure réponse immunitaire humorale contre l'antigène TI-2. De plus, les cellules B-1 *APS*^{-/-} présentent également une réduction de la quantité de filaments d'actine après stimulation du BCR (Iseki et al., 2004). Dans cette même optique, les souris transgéniques *APS* présentent une diminution des cellules B de la cavité péritonéale et de la rate, mais aussi une diminution de la prolifération des lymphocytes B matures induite par l'activation du BCR. Ces résultats suggèrent que APS régule négativement la signalisation du BCR et la réorganisation de l'actine dans les cellules B matures (Iseki et al., 2005).

Au niveau moléculaire, les résultats de notre équipe ont mis en évidence des complexes de signalisation auxquels participe la protéine APS, dans les cellules B matures. Ainsi, nous avons mis en évidence une co-localisation entre APS et ses partenaires, dont BCR, Cbl, Vav et la Syk après stimulation du BCR dans des cellules B mature surexprimant des formes WT et mutées de APS. Notre analyse fonctionnelle de ces interactions a démontré le rôle régulateur de l'adaptateur APS dans l'activation et la stabilité de Syk, probablement via l'interaction de APS avec Cbl jouant un rôle dans l'activation et la dégradation de cette kinase. D'autre part, APS est également impliqué dans le remodelage du cytosquelette. Cette fonction serait favorisée par son interaction avec certains de ses partenaires (BCR et Vav) et possiblement d'autres effecteurs encore inconnus ayant un rôle important dans cette fonction biologique (Dondi et collaborateurs., manuscrit en préparation).

Bien que la protéine SH2-B a été identifiée comme partenaire du récepteur à l'IgE dans les mastocytes (Osborne et al., 1995), elle ne semble pas jouer de rôle particulier dans le système hématopoïétique comme l'ont démontré les études réalisées sur les souris déficientes pour SH2-B (Tableau 4)

Quant à la protéine humaine LNK, elle a été clonée en utilisant l'ADNc de la lignée lymphocytaire T Jurkat. Cette étude a montré que LNK se lie via son domaine SH2 au motif ITAM du récepteur à l'antigène des cellules T (TCR) et qu'elle régule négativement les voies de signalisation en aval du récepteur dans les cellules Jurkat (Li et al., 2000). Cependant, l'absence

d'anomalies de la lignée lymphocytaire T, chez les souris *Lnk*^{-/-} remet en question la signification biologique de LNK dans ces cellules.

Tableau 5 : Rôle des protéines de la famille LNK dans le système hématopoïétique

Adaptateur	Région de liaison	Partenaires	Voie de signalisation	Rôle	Système d'étude	Référence
LNK	Nter	JAK2	TPO	Prolifération	Cellules myéloïdes <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Baran-Marszak et al., 2010)
	SH2	JAK2/3	TPO/ EPO/ IL-7	Quiescence Prolifération	HSC, cellules myéloïdes (érythroïdes et mégacaryocytaires) et pré-B <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Cheng et al., 2016 ; Tong and Lodish, 2004; Tong et al., 2005) (Bersenev et al., 2008) (de Graaf and Metcalf, 2011)
		Kit	SCF	Prolifération Migration	HSC, pré-B et mastocytes <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Nobuhisa et al., 2003) (Takaki et al., 2002) (Simon et al., 2008)
		ITAM	TCR	Nd	Lignée T Jurkat	(Li et al., 2000)
		FLT3	FL	Prolifération	Lignées hématopoïétiques et cellules Lin- <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Lin et al., 2012)
		Intégrine Fyn	VLA-4 TPO	Adhésion plaquettaire	Mégacaryocytes/ plaquettes <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Takizawa et al., 2010)
		JAK2	GM-CSF	Prolifération	Cellules dendritiques de souris <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Mori et al., 2014)
		c-Fms	M-CSF	Prolifération Migration	Macrophages <i>Lnk</i> ^{-/-}	(Gueller et al., 2011)
	SH2	PDGFR	PDGF	Prolifération	Lignée cellulaire hématopoïétique et 293T	(Gueller et al., 2011)

Suite tableau 5						
APS	SH2	EPOR	EPO	Prolifération	Lignée cellulaire B et 293T	(Wakioka et al., 1999)
		Complexe BCR	BCR	Prolifération	Cellules B	(Iseki et al., 2005)
		Kit	SCF	Nd	Lignée cellulaire	(Kubo-Akashi et al., 2004)
APS	Y en C-ter	Cbl	EPO	Prolifération	Lignée cellulaire B et 293T	(Wakioka et al., 1999)
SH2-B	Nter SH2	EPOR	EPO	Prolifération	Lignée hématopoïétique BaF3, érythroblastes primaires	(Javadi et al., 2012)

Violet : Rôle activateur des protéines ; Nd : non déterminé dans l'article

B. Rôle dans le système vasculaire

Le TNF α est une cytokine pro-inflammatoire qui contribue au processus d'inflammation dans les cellules endothéliales vasculaires. Il y a quelques années, trois groupes ont montré qu'en plus de son expression dans le système hématopoïétique, LNK est également exprimée dans le système vasculaire, notamment dans les cellules endothéliales (progéniteurs et cellules matures). LNK a d'abord été identifiée dans les cellules endothéliales qui recouvrent l'aorte dorsale dans la région AGM à 11.5 jours de développement embryonnaire, où elle inhibe, via son domaine SH2, le développement hématopoïétique induit par le facteur SCF (Nobuhisa et al., 2003). L'expression et la fonction de LNK ont ensuite été retrouvées dans les cellules endothéliales matures (Fitau et al., 2006; Wan et al., 2006). En effet, l'équipe de Devallière a démontré que le TNF α induit rapidement l'expression de l'ARNm et de la protéine LNK, ainsi que sa phosphorylation. De plus, LNK est capable d'inhiber l'expression de molécules d'adhésion, telles VCAM-1 et l'E-sélectine, dans les EC vasculaires activées (Devallière et al., 2012). En outre, LNK régule certaines voies de signalisation activées par le TNF α dans les EC vasculaires. Elle inhibe la cascade ERK1/2 et en même temps, favorise l'activation de la voie PI3-Kinase/AKT et la phosphorylation de la protéine synthétase d'oxyde nitrique (eNOS) (Fitau et al., 2006).

D'autre part, LNK a été également impliquée comme un régulateur important des voies de signalisation des Intégrines dans les EC. Dans ce système, LNK est capable d'interagir directement avec la kinase associée aux intégrines (ILK), ce qui permet la phosphorylation de plusieurs kinases et protéines : AKT, GSK3 β , paxillin et FAK (Devallière et al., 2012). Ces interactions ont comme conséquence le contrôle de la formation d'Adhésions Focales (FA) et la migration des cellules endothéliales. De plus, la protéine α -parvin a été identifiée comme une cible moléculaire de LNK dans les voies activées par les intégrines. Ainsi, l'ensemble des résultats a permis de proposer un modèle dans lequel LNK inhibe l'expression de l' α -parvin via son interaction avec la kinase ILK, ce qui résulte en l'inhibition de l'adhésion et une diminution de la migration (Figure 19). Enfin, ces résultats ont confirmé que LNK est un adaptateur clé dans les cellules endothéliales via deux voies de signalisation, celles du TNF α et de la β -intégrine.

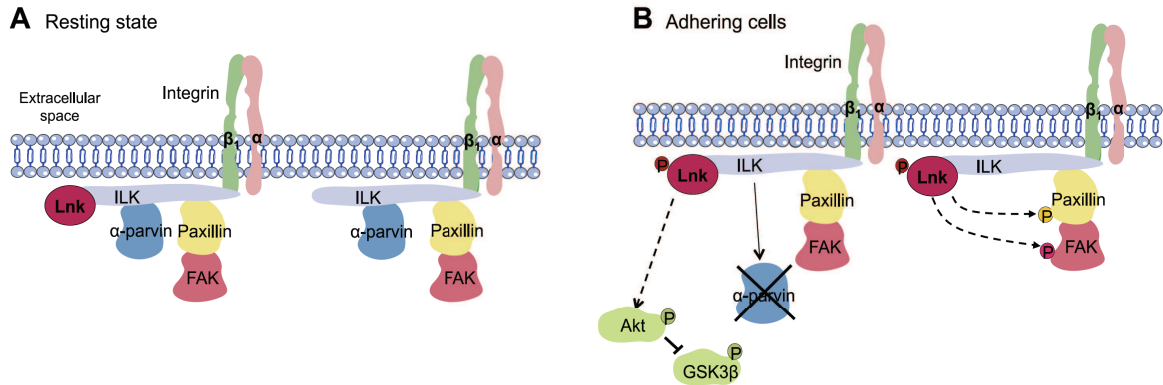


Figure 19 : Modèle d'action de LNK via les intégrines dans les cellules endothéliales

A) Modèle à l'état quiescent des cellules : LNK non phosphorylé est constitutivement lié à ILK.
 B) L'adhésion des EC par la sous-unité de l'intégrine $\beta 1$ induit la phosphorylation de LNK et son recrutement aux adhésions focales (FA) via son interaction avec ILK. Ainsi, LNK diminue l'expression de α -parvin, en inhibant le complexe α -parvin/ILK et facilite la phosphorylation des autres protéines. Ceci bloque la dissociation des FA, augmente l'attachement cellulaire des EC et donc réduit leur motilité. D'après Devallière et collaborateurs (Devalliere et al., 2012).

C. Dans le système nerveux

SH2-B et APS sont des substrats des récepteurs Trk activés par le NGF. Ces adaptateurs forment des homo- ou hétérodimères via leur domaine de dimérisation et se lient aux récepteurs Trk via leur domaine SH2 afin de stimuler son activation (Qian and Ginty, 2001). En effet, le NGF stimule la phosphorylation de SH2-B et APS sur les résidus tyrosine, thréonine et sérine, ce qui permet à SH2-B d'interagir avec le récepteur TrkA afin de favoriser le développement et la différenciation des neurones (Eggert et al., 2000; Qian and Ginty, 2001 ; Rui et al., 1999a ; Rui et al., 1999b).

En revanche, LNK semble avoir un rôle d'inhibiteur dans ce même système. L'équipe de Wang a effectivement montré dans les cellules neuronales primaires de rat et la lignée cellulaire PC12 que LNK inhibe les voies de signalisation activées par le NGF en régulant leur activation. Cette inhibition se fait via le domaine SH2 de LNK, qui en se liant au récepteur TrkA activé, conduit à la phosphorylation de l'adaptateur et à l'inhibition des voies de signalisation en aval, dont celles impliquant ERK1/2, AKT et PLC γ , ce qui bloque la différenciation et la croissance des neurites. De plus, la surexpression de LNK dans les cellules PC12, inhibe l'interaction entre SH2-B et le récepteur TrkA. Ceci suggère que LNK entre en compétition avec SH2-B pour se lier à TrkA afin d'inhiber la voie de signalisation induite par le NGF (Wang et al., 2011).

D. Rôle dans d'autres systèmes cellulaires

Les rôles fonctionnels des protéines adaptatrices de la famille LNK dans d'autres systèmes cellulaires sont répertoriés dans le tableau 6, en détaillant leur partenaire et leur site d'interaction.

1. Les voies de signalisation de l'insuline et de la leptine

Les tissus adipeux jouent un rôle majeur dans le métabolisme des lipides et du glucose. Ils agissent de façon endocrine en sécrétant deux hormones majoritaires qui sont l'insuline et la leptine ainsi que le facteur de croissance « Insulin Growth Factor-1 » (IGF-1).

Les souris déficientes en APS présentent une sensibilité élevée à l'insuline associée à une hypo-insulinémie (Minami et al., 2003). En effet, la protéine APS a été identifiée comme partenaire du récepteur de l'insuline (IR) par le système de sélection double hybride. De plus, des expériences dans des lignées cellulaires HEK293T et adipocytaires CHO ont montré que l'insuline stimule l'association transitoire de APS, via son domaine SH2, avec le domaine kinase de l'IR, ce qui entraîne la phosphorylation de APS sur des résidus tyrosine, notamment le résidu Y618. Cette phosphorylation permet alors l'association de Cbl avec ce résidu phosphorylé (Hu and Hubbard, 2006 ; Liu et al., 2002; Moodie et al., 1999). Ainsi, l'association APS/Cbl permet l'ubiquitination du récepteur induisant son internalisation, sans

pour autant intervenir dans la dégradation du récepteur (Kishi et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré que l'association de APS et Cbl via la protéine « Cbl-associated protein » (CAP) intervient dans la régulation de la translocation de GLUT4 et le transport du glucose induit par l'insuline (Liu et al., 2002). Cependant cette fonction n'a pas été confirmée dans les souris *APS^{-/-}*. En ce qui concerne *APS β* , il est capable d'inhiber l'activité de *APS α* et SH2-B sur l'IRS-1 en réponse à l'insuline (Li et al., 2007a).

La protéine SH2-B est fortement exprimée dans les tissus adipeux et comme pour l'adaptateur APS, elle interagit via son domaine SH2 avec le domaine kinase de l'IR (Rui et al., 1997). Ces résultats suggèrent l'implication de cet adaptateur dans la voie de l'insuline, fonction qui a été confirmée par le phénotype des souris *SH2B^{-/-}* présentant une hyperinsulinémie, une hyperglycémie et une intolérance au glucose (Duan et al., 2004).

Ainsi, les protéines APS et SH2-B s'associent au même site dans la région kinase de l'IR. Cependant, le phénotype des souris déficientes pour ces deux gènes est très différent, indiquant que les adaptateurs APS et SH2-B exercent des fonctions différentes *in vivo* (Duan et al., 2004).

D'autre part, la leptine est une hormone produite et sécrétée par les adipocytes, permettant de réguler le métabolisme et la perte de poids. Au niveau des neurones de l'hypothalamus, elle active principalement les voies de signalisation JAK2/STAT3 et IRS/PI3K. Ainsi, les souris *SH2-B^{-/-}* développent une résistance à la leptine associée à une obésité, suggérant que SH2-B régule positivement la signalisation induite par la leptine au niveau des neurones hypothalamiques (Li et al., 2007b; Ren et al., 2005). En réponse à la leptine, JAK2 permet l'activation du récepteur à la leptine et l'activation des molécules de signalisation dont STAT3 et l'IRS-1 et 2. La formation du complexe IRS/JAK2 facilite ensuite l'activation de la PI3K (Duan et al., 2004; Li et al., 2007b; Ren et al., 2005).

En ce qui concerne l'adaptateur APS, les souris *APS^{-/-}* présentent un taux élevé de leptine. Cependant, il semble que APS ne soit pas nécessaire pour l'homéostasie du glucose.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence l'importance de SH2-B dans la régulation du métabolisme via la voie de la leptine, tandis que APS exerce un contrôle négatif sur cette voie sous certaines conditions.

2. Les voies de signalisation de l'hormone de croissance

L'adaptateur SH2-B est également impliqué dans la signalisation de l'hormone de croissance (GH) en se liant de deux manières à JAK2. D'abord, elle s'associe via sa région N-terminale à JAK2 inactif permettant le maintien de la kinase à l'état basal et ensuite via son domaine SH2 à JAK2 actif. Dans les lignées 3T3T-F442A (adipocytes) et COS (fibroblastes), l'expression de SH2-B stimule la phosphorylation de JAK2 et donc l'activation de STAT5 via son domaine SH2 en réponse à la GH (Rui et al., 2000). Ainsi, le domaine SH2 est critique pour la fonction de SH2-B. En outre, SH2-B agit également comme une molécule d'ancrage en recrutant Rac et probablement d'autres protéines régulant Rac ou le cytosquelette d'actine. En

effet, SH2-B régule positivement le cytosquelette d'actine et la motilité cellulaire de fibroblastes 3T3 en réponse à la stimulation par la GH (Diakonova et al., 2002).

Tableau 6 : Rôle des protéines adaptatrices de la famille LNK dans d'autres systèmes cellulaires

Adaptateur	Région d'interaction	Partenaires	Voie de signalisation	Rôle	Système d'étude	Référence
SH2-B	Nter	SH2-B APS	NGF	Prolifération	HEK293T	(Qian and Ginty, 2001)
SH2-B β	Nter SH2	JAK2	GH Leptine	Activation signalisation Métabolisme	Lignée 3T3-F442A adipocytes COS	(Rui et al., 2000) (Li et al., 2007b)
SH2-B	SH2	IR Adhésion focale	Insuline GH	Métabolisme Adhésion Migration	Lignées CHO, 3T3-F442A	(Li et al., 2007a ; Rui et al., 2000)
SH2-B	SH2	PDGFR	PDGF	Prolifération	Lignée fibroblastes NIH-3T3	(Yousaf et al., 2001)
SH2-B APS	SH2	Trk	NGF	Différenciation	Lignée neuroblastome SH-SY5Y PC12 HEK293T	(Eggert et al., 2000; Qian and Ginty, 2001; Rui et al., 1999a; Rui et al., 1999b)
APS	Nter	SH2-B APS	NGF	Prolifération	HEK293T	(Qian and Ginty, 2001)
APS	SH2	APS IR	Insuline	Nd	CHO-IR Cos	(Hu et al., 2003) (Hu and Hubbard, 2006)
APS	SH2 Y618 en C-ter	PDGFR Cbl	PDGF	Prolifération	Lignée fibroblastes NIH-3T3	(Yokouchi et al., 1999)
LNK	SH2	Trk	NGF	Prolifération	Lignée PC12 et neuronales primaires	(Wang et al., 2011)

Violet : Rôle activateur des protéines ; Nd : non déterminé dans l'article

IV. Mécanisme d'action des adaptateurs de la famille LNK : le modèle SH2-B/JAK2

Comme décrit dans ce chapitre, les membres de la famille LNK contrôlent un grand nombre de voies de signalisation activées par les kinases JAK, associées aux récepteurs aux cytokines et les RTK. Le mécanisme par lequel les protéines de la famille LNK agissent n'a pas été complètement déterminé. Cependant, des études biochimiques de cristallisation et de modélisation sur SH2-B et APS, ont permis de mettre en évidence leur mode de fonctionnement, par leur capacité à former des homo- ou des hétéro-oligomères. Cette structure leur permet de s'associer de façon directe avec le récepteur ou avec des molécules telles JAK2, régulant ainsi l'activité kinase de ces protéines. De ce fait, deux modèles de régulation de l'activité kinase JAK2 par SH2-B via la GH et la leptine ont été proposés (Maures et al., 2007) :

Le premier modèle implique la dimérisation de SH2-B où l'adaptateur joue un rôle d'activateur pour la kinase JAK2 suite à la stimulation par la GH (Rui et al., 2000). En effet, l'équipe de Nishi a démontré que SH2-B β forme un homodimère avec un des isoformes de SH2-B via leur domaine de dimérisation. Dans leur modèle, ce dimère facilite et stabilise la dimérisation des protéines JAK2 associées après stimulation du récepteur, ce qui augmente la transphosphorylation de JAK2 nécessaire pour son activité kinase. En effet, la dimérisation de SH2-B est nécessaire pour la dimérisation de JAK2 car il permet la colocalisation de SH2-B et JAK2, la liaison de SH2-B via son domaine SH2 au résidu tyrosine phosphorylé Y813 de JAK2 et par conséquent, la phosphorylation de l'adaptateur par la kinase. Ceci a été confirmé par la protéine SH2-B tronquée pour ce domaine qui agit comme un dominant négatif sur l'activation de JAK2 (Figure 20) (Hu and Hubbard, 2006; Nishi et al., 2005).

Le deuxième modèle suggère que SH2-B n'est qu'un adaptateur pour JAK2 dans la voie de la leptine. La leptine se lie à son récepteur permettant la transphosphorylation et l'activation de JAK2. SH2-B se lie ainsi au résidu Y813 phosphorylé de JAK2 via son domaine SH2, induisant sa phosphorylation sur des résidus tyrosine. De cette façon, les résidus tyrosine phosphorylés de SH2-B permettent aux protéines IRS de s'associer. JAK2 peut ainsi phosphoryler ces protéines de signalisation dont les résidus tyrosine phosphorylés servent de site d'ancrage à la PI3K (Li et al., 2007b; Maures et al., 2007) (Figure 21).

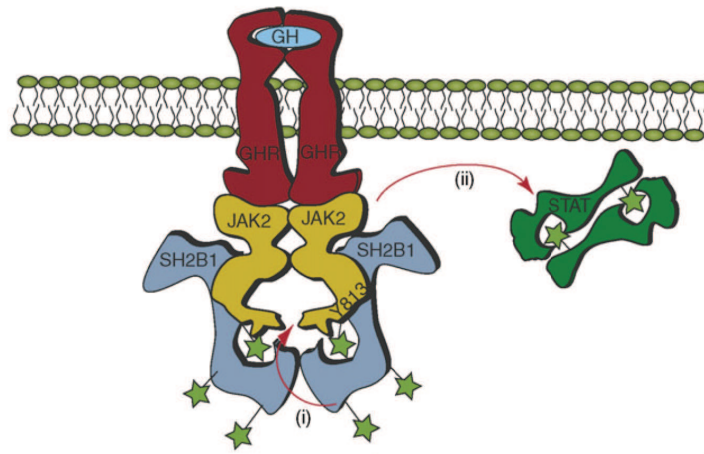


Figure 20 : Mécanisme d'action de SH2-B sur JAK2 stimulé par la GH : rôle d'activateur

La GH se lie à son récepteur (GHR) induisant la transphosphorylation et l'activation de JAK2. Les résidus tyrosine phosphorylés (étoile verte) Y813 de JAK2 permettent le recrutement des protéines SH2-B et sa phosphorylation par la kinase. Ainsi, SH2-B stimule directement l'activité de JAK2 (i) induisant l'augmentation de la phosphorylation de ses partenaires (ii). D'après Maures et collaborateurs (Maures et al., 2007).

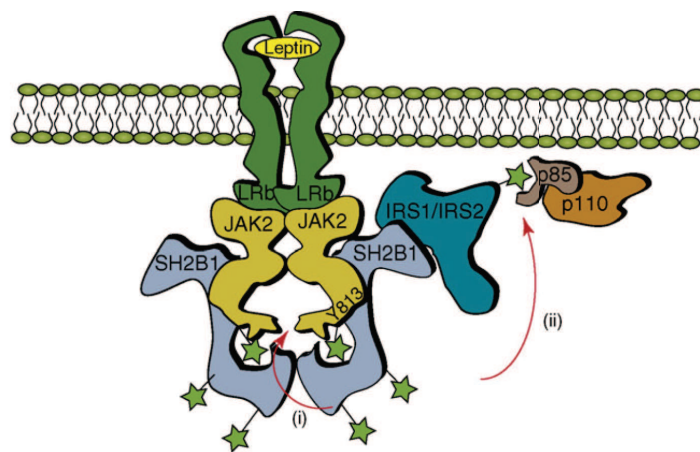


Figure 21 : Mécanisme d'action de SH2-B sur JAK2 stimulé par la leptine

La leptine se lie sur son récepteur (LRb) induisant la transphosphorylation et l'activation de JAK2. Les résidus tyrosine phosphorylés (étoile verte) Y813 de JAK2 permettent le recrutement des protéines SH2-B et leur phosphorylation. Puis SH2-B stimule directement l'activité de JAK2 et se lie simultanément aux IRS (i) résultant en l'activation des IRS par JAK2. La phosphorylation des IRS permet le recrutement et l'activation de la PI3K (ii). D'après Maures et collaborateurs (Maures et al., 2007).

CHAPITRE IV :

RÔLE DE LNK DANS LES PATHOLOGIES HUMAINES

Les chapitres précédents ont décrit les voies de signalisation impliquées dans l'hématopoïèse et l'importance de leur régulation. La dérégulation de ces voies peut conduire à des pathologies auto-immunes, inflammatoires chroniques ou lympho/myéloprolifératifs.

La protéine régulatrice LNK est un inhibiteur impliqué dans le développement de pathologies hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes, dont les Néoplasmes Myéloprolifératifs (NMP). De plus, elle est aussi impliquée dans la leucémie lymphoblastique aiguë du type B (LLA-B), mais également dans des maladies inflammatoires chroniques et vasculaires.

Nous nous sommes ainsi intéressés plus particulièrement au rôle de LNK dans les NMP. De ce fait, ce chapitre détaillera l'état des connaissances actuelles sur les aspects cliniques et moléculaire de ces hémopathies. L'importance biologique de LNK et de ses anomalies génétiques retrouvées chez les patients atteints de NMP, ainsi que dans d'autres pathologies humaines seront également discutées.

I. Les Néoplasmes Myéloprolifératifs

A. Caractéristiques cliniques

Les Néoplasmes Myéloprolifératifs sont des maladies hétérogènes clonales des HSC, caractérisées par une production excessive de cellules sanguines matures due à leur hypersensibilité aux cytokines. Elles ont été classifiées pour la première fois en 1951 par William Dameshek par rapport à leurs ressemblances au niveau des caractéristiques cliniques (Dameshek, 1951). Ces pathologies sont généralement asymptomatiques et diagnostiquées à la suite de bilan sanguin avec une incidence annuelle entre 0,5 et 2,5 cas pour 100 000 personnes. L'organisation mondiale de la santé (OMS) les a divisées en fonction du statut de translocation des chromosomes 9 et 22 [t(9;22)], appelée chromosome Philadelphie (Ph), les lignées myéloïdes impliquées et le taux de transformation de la leucémie myéloïde aiguë (LMA).

Selon l'OMS, il existe plusieurs types de NMP dont les plus fréquentes sont la leucémie myéloïde chronique (LMC), la polycythémie vraie (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et la myélofibrose primitive (MFP), collectivement appelées NMP « classique ». La LMC se distingue des autres NMP par la présence du chromosome Ph, généré par la fusion des gènes « Breakpoint Cluster Region » (BCR) et Abelson (ABL). La fusion BCR/ABL entraîne alors l'activation constitutive de la tyrosine kinase ABL, impliquée dans la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose responsables de la maladie. (Campbell and Green, 2006) (Vakil and Tefferi, 2011).

Quant aux pathologies PV, TE et MFP, elles sont dites « BCR-ABL1-négatif » ou « chromosome Ph-négatif » (Ph⁻). Bien que les NMP Ph⁻ aient des caractéristiques biologiques similaires, elles sont cliniquement distinctes avec des phénotypes et une progression de la maladie hétérogène. Ainsi, la PV est caractérisée par une expansion excessive des cellules de la lignée érythrocytaire et une prolifération accrue des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse. La production anormale de globules rouges conduit à une augmentation du volume et de la

viscosité sanguine, pouvant entraîner des hémorragies et des thromboses. Les patients atteints de TE ont une prolifération accrue de mégacaryocytes, de plaquettes et présentent occasionnellement des thrombocytoses. Un pourcentage de 10 à 20% des patients PV et TE ont une progression de la maladie en myélofibrose. Cette maladie est différente au niveau des anomalies moléculaires comparé à la MFP mais similaire pour les caractéristiques cliniques. La MFP est la forme la plus sévère des NMP. Elle est caractérisée par une prolifération excessive des cellules myéloïdes, notamment les mégacaryocytes et les granulocytes, et accompagnée d'une fibrose de la moelle osseuse. Ces patients peuvent aussi présenter une cytopénie du sang périphérique avec une leuco-érythroblastose, une inflammation systémique et une hématopoïèse extramédullaire aboutissant à une splénomégalie et une hépatomégalie (Campbell and Green, 2006). En outre, la MFP peut survenir *de novo* ou suivant une PV ou une TE (Myélofibrose post-PV et post-TE). À long terme, 2 à 7% des patients PV et TE, et 8 à 30% des patients MFP ont une progression de la maladie en LMA (Figure 22).

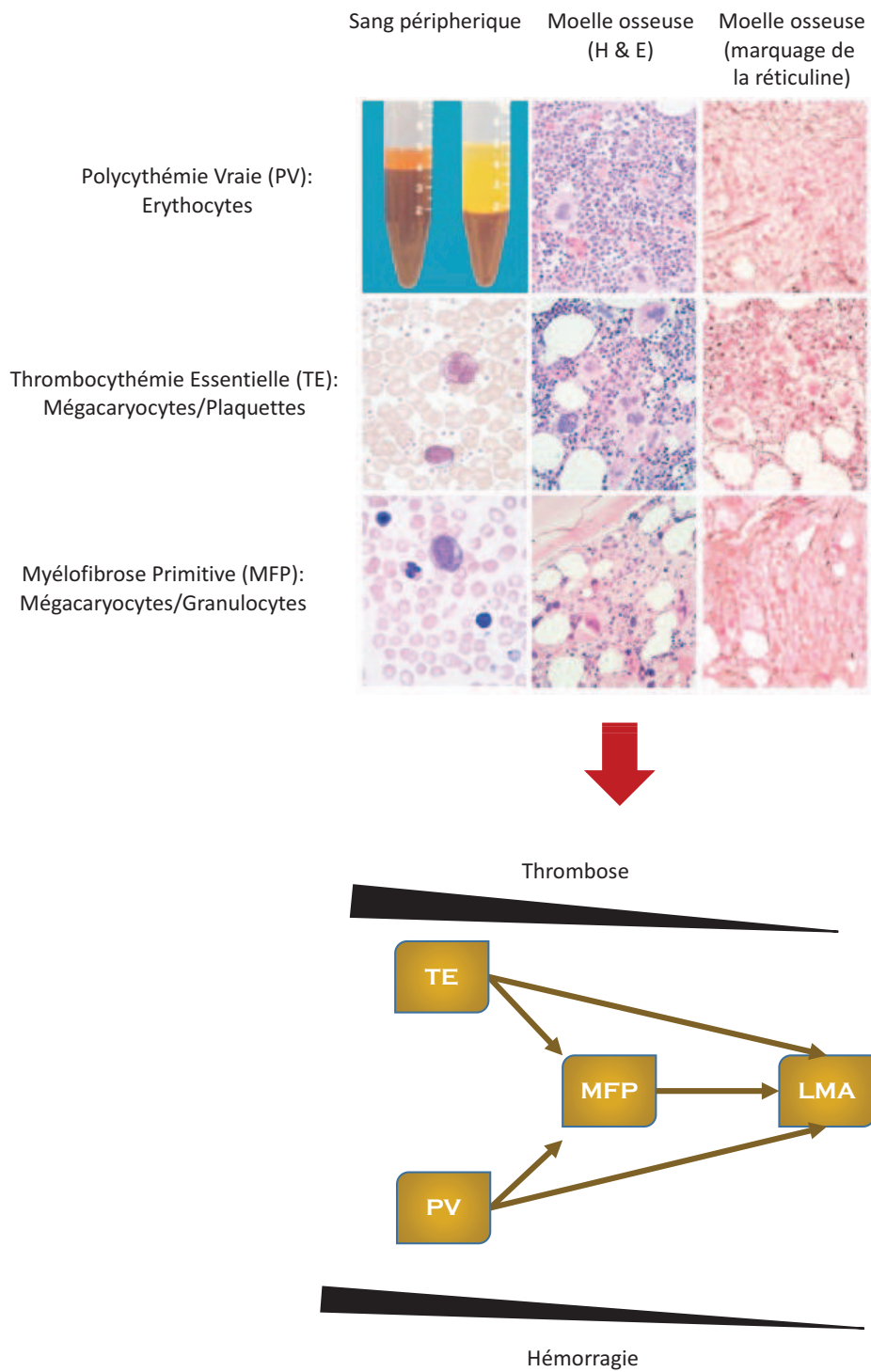


Figure 22 : Caractéristiques cliniques et évolution des NMP (Ph)

Thrombocythémie Essentielle (TE) ; Polycythémie Vraie (PV) ; Myélofibrose Primitive (MFP) ; Leucémie Myéloïde Aiguë (LMA)

B. Caractéristiques moléculaires

En 2005, la découverte d'une mutation gain de fonction dans la kinase JAK2, appelée JAK2-V617F, chez les patients atteints de NMP Ph⁺ fut une avancée majeure dans la compréhension de ces pathologies. Cette découverte a été rapidement suivie de l'identification de mutations somatiques sur d'autres protéines, avec une fréquence variable. Généralement, ces mutations ciblent des gènes impliqués dans la signalisation, dans la dérégulation épigénétique et dans la transformation leucémique (Tableau 7) (Vainchenker et al., 2011).

Il existe plusieurs stades d'évolution de ces NMP dont la phase chronique, la phase d'accélération et la phase de transformation leucémique. De ce fait, un certain nombre d'études se sont focalisées sur le rôle de mutations somatiques dans les différentes étapes de la progression de ces maladies. Ces mutations chez les patients atteints NMP peuvent être classées en deux groupes selon leur fonction. Le premier groupe comprend les mutations déterminantes conduisant au phénotype NMP, capables d'induire la croissance clonale des cellules, telles que les mutations somatiques de *JAK2*, *MPL* et de la calréticuline (*CALR*). Ce type de mutations procure un avantage sélectif à un clone, causant son expansion. Cependant, ces mutations ne sont pas nécessairement initiatrices du développement de ces pathologies. Le deuxième groupe inclut les mutations modifiant le phénotype NMP induisant l'accélération et la progression de ces maladies. Ces mutations mènent, par la suite, à une transformation leucémique. Par ailleurs, ces dernières peuvent être subdivisées en deux groupes. Le premier est constitué des mutations dites initiatrices, conférant des avantages aux clones, sans induire des phénotypes de la maladie (exemple, les gènes *TET2* et *DNMT3A*). Quant au deuxième groupe, il comprend les mutations capables d'agir en synergie avec les mutations déterminantes du phénotype NMP et d'en modifier les effets. Ces mutations se trouvent sur des protéines de signalisation (LNK, CBL, « Neuroblastoma RAS » (NRAS), « Neurofibromatosis 1 » (NF1)), régulateurs épigénétiques (*EZH2*, *ASXL1*), ou encore facteurs de transcription (« IKAROS zinc finger protein 1 » (IKZF1), « Runt-related transcription factor 1 » (RUNX1)). Toutefois, la seule présence de ces mutations n'entraîne pas un phénotype NMP (Milosevic and Kralovics, 2013).

Ces données suggèrent que les NMP sont des pathologies complexes, résultant de la combinaison de plusieurs phénomènes génétiques. Cependant, elles ont toutes en commun une hyper-activation de la voie de signalisation JAK/STAT avec de nombreuses mutations sur des protéines impliquées dans cette voie. Par conséquent, la dérégulation de la voie JAK2/STAT semble être l'origine du développement des NMP Ph⁺ (Pasquier et al., 2014).

Tableau 7 : Fréquences des mutations retrouvées dans les NMP Ph

Gène	MFP	TE	PV
<i>Molécules de signalisation</i>			
JAK2-V617F	50-65	50-65	90-95
JAK2 exon 12	-	-	2-4
CALR	20-35	20-25	-
MPL-W515K/L	4-10	2-5	-
Cbl	4-6	-	-
LNK	3-6	3-6	**
<i>Régulateurs épigénétiques</i>			
TET2	8-17	4-5	10-16
ASXL1	7-23	5-8	2-5
DNMT3A	6-15	3	5-7
IDH1/2	4	<1	2
EZH2	5-13	-	3
SETBP1	2,5	-	-
<i>Epissage ARN</i>			
SRSF2	8,5	-	-
<i>Autres</i>			
TP53	2-4	-	-

« ten eleven translocation member 2 » (TET2), « additional sex combs like 1 » (ASXL1), « DNA methyltransferase 3A » (DNMT3A); « isocitrate dehydrogenase » (IDH1/2); « enhancer of zeste homolog 2 » (EZH2); « tumor protein 53 » (TP53); « SET protein binding 1 » (SETBP1); « serine and arginine rich splicing factor 2 » (SRSF2). **Rarement identifiées chez les patients PV négatifs pour JAK2-V617F. D'après Sochacki et collaborateurs (Sochacki et al., 2016).

1. Les principales mutations déterminantes menant au phénotype NMP

a. Les mutations de JAK2

Comme décrit dans le chapitre 2, la kinase JAK2 joue un rôle important dans l'hématopoïèse normale en réponse aux cytokines, par conséquent la dérégulation de cette kinase peut entraîner le développement de plusieurs pathologies hématopoïétiques. Il existe une substitution d'une guanine en thymine du nucléotide 1849 du gène JAK2, situé sur le chromosome 9p24 chez les patients atteints de NMP Ph^v, dans l'exon 14. Cette mutation correspond à la substitution de l'acide aminé valine (V) en position 617 par une phénylalanine (F), V617F, dans le domaine JH2 de la kinase (Figure 23A) (Baxter et al., 2005 ; James et al., 2005 ; Kralovics et al., 2005 ; Levine et al., 2005). La présence de cette mutation a été identifiée dans plus de 95% des patients atteints de PV et plus de 50 % des patients TE et MFP. De ce fait, elle est, à présent, un des biomarqueurs de ces pathologies. La plupart de patients atteints de PV et certains MFP sont homozygotes pour cette mutation, résultant de la recombinaison mitotique du chromosome 9p de JAK2. Cette recombinaison est rarement détectée chez les patients ET.

Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées afin de comprendre le fonctionnement de cette mutation somatique dans la pathogénèse des NMP. La mutation JAK2-V617F affecte le domaine JH2 de la protéine, en abolissant sa fonction inhibitrice, ce qui conduit à l'activation constitutive de la kinase. Afin d'induire la transformation cellulaire et d'activer les cibles en aval, la kinase activée nécessite toujours l'interaction via son domaine FERM avec les récepteurs fonctionnels de cytokines homodimériques EPOR, MPL ou G-CSFR. Ces trois récepteurs contrôlent les lignées érythrocytaires, mégacaryocytaires et granulocytaires, ce qui explique pourquoi la prolifération dépendante de JAK2-V617F affecte ces trois lignées (Funakoshi-Tago et al., 2010; Lu et al., 2005). Ainsi, l'expression de la forme JAK2-V617F dans les lignées hématopoïétiques entraîne l'activation constitutive des voies de signalisation JAK2/STAT1/3/5, MAPK et PI3K/Akt (James et al., 2005 ; Levine et al., 2005). L'analyse de ces différentes voies dans des modèles animaux, a mis en évidence l'importance de l'activation de protéines STAT dans le caractère oncogénique de JAK2-V617F, conduisant au phénotype NMP. Les phénotypes PV, TE et MFP ont respectivement été associés à une activation importante de STAT5, STAT1 et STAT3. Cependant, ces études ont surtout identifié STAT5 comme facteur clé pour la fonction oncogénique de JAK2-V617F dans les NMP. Par conséquent, STAT5 pourrait représenter une cible pour l'inhibition de cette voie. Récemment, des inhibiteurs de STAT5 ont été générés et utilisés *in vivo* (Skoda et al., 2015).

Bien que les protéines STAT soient des protéines importantes dans la signalisation de JAK2 oncogénique, d'autres voies de signalisation en aval de JAK2 y participent également, y compris les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et Ras/MAPK. Dans ce contexte, des inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR ont été étudiés *in vitro* et dans les modèles NMP murins. Ils

permettent une inhibition de la croissance des cellules exprimant JAK2-V617F. L'effet du ruxolitinib, inhibiteur de JAK2, en synergie avec les effets des inhibiteurs de la voie PI3K permet d'inhiber d'avantage, la croissance des cellules exprimant JAK2-V617F. De ce fait, certains inhibiteurs de la voie PI3K sont déjà en essais cliniques chez les patients atteints de NMP (Choong et al., 2013).

En plus de son rôle important dans l'activation de voies de signalisation des cytokines, JAK2 est capable d'agir comme régulateur épigénétique, notamment de l'histone H3 ou de l'arginine méthyltransférase (PRMT5) dans le noyau. Dans les cellules hématopoïétiques, JAK2 nucléaire phosphoryle l'histone H3 sur le résidu Y41, ce qui bloque le recrutement de la protéine répresseur de l'hétérochromatine 1 α (HP1 α), permettant ainsi l'augmentation de l'expression de plusieurs gènes, dont l'oncogène LMO2 (Dawson et al., 2009). JAK2-V617F interagit et phosphoryle également la protéine PRMT5 avec une affinité plus importante que JAK2-WT. Cette propriété est renforcée par JAK2-V617F et abolit l'interaction entre PRMT5 et son cofacteur MEP50, conduisant à une activité méthyltransférase diminuée (Liu et al., 2011). Ainsi, ce rôle nucléaire émergent de la mutation JAK2-V617F semble révéler des effets spécifiques de cette mutation sur la chromatine, pouvant aidé à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans les rares cas de PV négatifs pour JAK2-V617F, un faible pourcentage (2-4%) de patients ont des mutations somatiques, gain de fonction, dans l'exon 12 de *JAK2* (Pietra et al., 2008). Ces mutations sont localisées dans la région entre les domaines SH2 et JH2, généralement entre les résidus 537 et 543, dont la mutation K539L, induisant l'activation constitutive de la kinase (Figure 23A). Bien que ces mutations ne soient pas situées dans le domaine régulateur JH2, elles peuvent modifier la structure de ce domaine d'une manière très similaire à celle de la mutation V617F. De ce fait, elles ont des conséquences fonctionnelles similaires sur le domaine JH2, conduisant à un phénotype myeloproliférative, démontré dans un modèle de greffe de moelle osseuse de souris. Les patients ayant la mutation JAK2-K539L ont une augmentation de l'érythrocytose, une diminution du taux d'EPO dans le sérum et les mêmes caractéristiques cliniques que les patients PV ayant JAK2-V617F (Scott et al., 2007). Cependant, les mutations de l'exon 12 ne sont pas associées aux patients TE et MFP, bien que les patients atteints de PV ayant la mutation JAK2K-539L, puissent évoluer vers une myélofibrose secondaire. De manière intéressante, le résidu F595, situé dans l'hélice C du domaine pseudokinase, s'est avéré nécessaire pour la fonction des mutants V617F et K539L, mais pas pour l'activation de JAK2-WT (Dusa et al., 2010). De ce fait, le résidu F595 pourrait être une cible afin bloquer sélectivement ces formes oncogéniques de JAK2.

D'autres mutations somatiques rares de *JAK2* ont également été retrouvées dans les NMP et dans les LLA-B (mutations exon 16) (Kearney et al., 2009; Pasquier et al., 2014). Plus récemment, un certain nombre de mutations germinales de *JAK2* ont été décrites dans des néoplasmes familiaux, la plupart d'entre elles sont associées à un phénotype de thrombocytose (Marty et al., 2014).

Puisque la majorité des mutations activatrices se trouvent dans le domaine JH2 de JAK2, important pour la fonction auto-régulatrice de la kinase, ceci suggère qu'elles diminuent cette fonction. Ainsi, ces mutations pourraient agir par un mécanisme allostérique. Des études récentes ont démontré que le domaine JH2 de JAK2 a une double activité kinase, permettant de phosphoryler des résidus tyrosine et sérine. La perturbation du site de fixation de l'adénosine triphosphate (ATP) dans le domaine JH2 de JAK2-V617F réduit l'activité kinase de cette forme oncogénique. Ces résultats suggèrent que la fixation de l'ATP au domaine JH2 est nécessaire pour augmenter l'activité de JAK2-V617F. Ainsi, en accord avec ces données, l'équipe de Silvennoinen propose un modèle d'activation de JAK2-V617F où en l'absence de cytokine, le récepteur lié aux deux protéines de JAK2 est maintenu à l'état inactif grâce à l'interaction entre les domaines JH2 et JH1 de JAK2 (Figure 23B gauche). Cette conformation serait en équilibre avec une forme partiellement active de la kinase où JH1 n'est plus en interaction avec JH2, ce qui favorise la transphosphorylation des kinases JAK2 sans stimulation par cytokine (Figure 23B centre). Lors de la présence de la mutation JAK2-V617F, cette conformation partiellement active serait favorisée, en déstabilisant l'interaction entre JH2 et JH1. La stimulation du récepteur par son ligand est alors nécessaire pour l'activation complète des protéines JAK2 en induisant un réarrangement structural des domaines cytoplasmiques du récepteur ce qui favorise le rapprochement des kinases et leur transphosphorylation (Figure 23B droite).

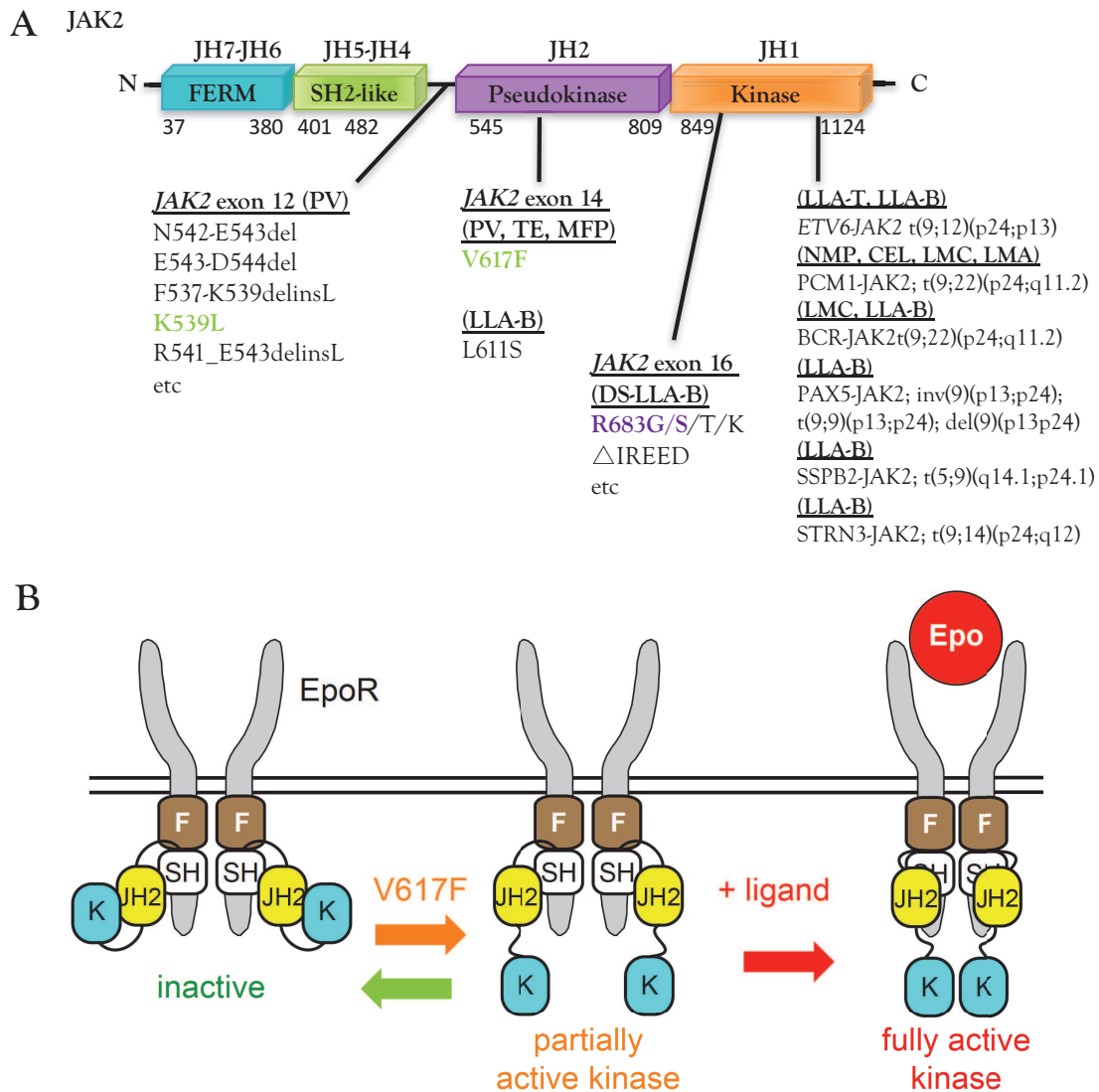


Figure 23 : Modèle d'activation de JAK2-V617F

A) Représentation schématique des mutations de JAK2 B) Modèle d'activation de JAK2. A gauche : à l'état basal, JH2 interagit avec JH1 afin de maintenir JAK2 dans un état inactif. Au centre : forme partiellement active de JAK2 où l'interaction JH2-JH1 n'a plus lieu en l'absence de cytokine, permettant aux protéines de se transphosphoryler, conformation favorisée par la présence de la mutation V617F. A droite : la liaison entre la cytokine et le récepteur permet un changement conformationnel du récepteur, un rapprochement des kinases et leur transphosphorylation. D'après Skoda et collaborateurs, Tefferi et collaborateurs (Skoda et al., 2015 ; Tefferi, 2016).

Depuis sa découverte, JAK2-V617F a été largement étudiée *in vivo* afin de disséquer précisément le rôle de cette mutation dans la pathogénèse des NMP. Pour cela, trois types de modèles murins différents ont été générés : rétrovirales, transgéniques et « knock-in » (Figure 24).

Les premiers modèles ont été générés par transplantation de la moelle osseuse exprimant JAK2-V617F après infection rétrovirale. Ces modèles ont montré que l'expression de JAK2-V617F *in vivo* est suffisante pour induire un phénotype NMP, notamment PV suivi d'une myélofibrose secondaire. Par ailleurs, ces modèles ont montré une variabilité dans le phénotype et la pénétrance de la maladie, probablement liées à une différence dans le niveau d'expression de l'oncogène. Pour contourner ce problème, trois groupes ont générés des modèles transgéniques conditionnels. Les principales conclusions tirées des modèles transgéniques sont que le niveau d'expression de JAK2-V617F détermine le phénotype du NMP. En effet, une expression basse de JAK2-V617F résulte en un phénotype semblable à la TE, tandis qu'une expression plus élevée de l'oncogène confère un phénotype similaire à une PV sans thrombocytose. En revanche, une expression similaire de JAK2-V617F et JAK2-WT génère des souris ayant un phénotype proche de PV avec une thrombocytose. Cependant, la diversité phénotypique de ces modèles animaux pourrait être liée à une différence dans le site d'insertion du transgène.

Pour valider cette hypothèse, quatre modèles de JAK2-V617F ont été développés en utilisant une approche « knock-in ». Dans ces modèles, la mutation a été mise sous le contrôle du promoteur de JAK2 endogène. Les principaux objectifs de ces modèles étaient : (i) reproduire les NMP humains à travers l'expression physiologique de JAK2-V617F, (ii) l'évaluation de l'impact du dosage des gènes JAK2-V617F sur le phénotype de la maladie et (iii) évaluer les effets de JAK2-V617F sur les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques. Ainsi, ces modèles murins ont montré que l'expression de JAK2-V617F hétérozygote aboutit à un phénotype PV, sauf dans le cas de l'expression de la protéine JAK2-V617F humaine qui est associée à un phénotype TE. De plus, la mutation JAK2-V617F semble apporter un avantage clonal aux HCS. Cependant, elle ne confère pas de propriétés d'auto-renouveau aux progéniteurs myéloïdes engagés (Li et al., 2011 ; Mullally et al., 2012).

Ces modèles récapitulent de manière fiable, les caractéristiques cliniques des patients atteints de NMP, chez la souris et ils ont contribué à faire progresser les connaissances biologiques sur les NMP JAK2-V617F-positif chez l'homme.

En ce qui concerne les mutations dans l'exon 12 de JAK2, les études *in vivo* ont montré que les souris transplantées avec des cellules médullaires exprimant le mutant JAK2-K539L, développent spécifiquement une polyglobulie et un phénotype myéloprolifératif (Scott et al., 2007).

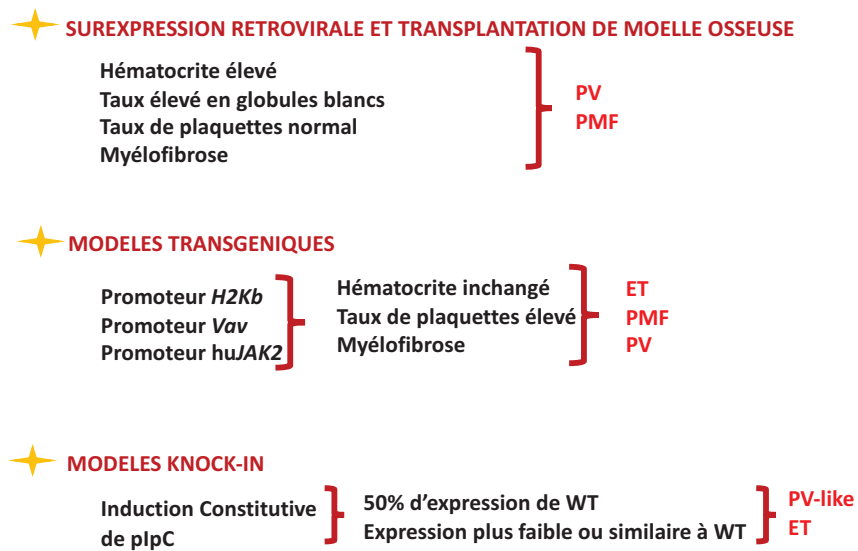


Figure 24 : Modèle de souris pour l'étude de JAK2-V617F

b. Les mutations du MPL

Les causes génétiques de TE et MFP sont plus hétérogènes que celles du PV où la mutation JAK2 est la principale responsable. L'utilisation de techniques de séquençage plus sensibles, ont permis d'identifier des mutations somatiques dans le récepteur MPL et plus récemment, dans la protéine chaperonne calréticuline chez des patients atteints de TE et MFP négatifs pour JAK2-V617F.

Les mutations activatrices du récepteur, peuvent être germinales dans de rares cas de thrombocytose familiale (MPL-S505N), ou somatiques chez des patients TE (4%) et des patients MFP (10%) négatifs pour JAK2-V617F (Ding et al., 2004 ; Pardanani et al., 2006). Les mutations les plus fréquentes se trouvent dans l'exon 10 et correspondent à une substitution du résidu tryptophane (W) en position 515 en lysine (K) ou leucine (L), W515K/L (Figure 25). Le mécanisme d'action de ces mutations faux-sens implique des modifications dans la conformation du dimère MPL et des kinases JAK2 associées. En effet, le résidu W515 du MPL, dans la région juxtamembranaire du récepteur, est essentiel au maintien de sa forme inactive, ce qui implique que la mutation de ce résidu mène à l'activation constitutive du récepteur (Staerk et al., 2006). Cette activation cause la phosphorylation constitutive de JAK2, STAT3 et STAT5, ainsi que des protéines ERK et AKT, entraînant une hypersensibilité à la TPO et la prolifération des lignées cellulaires, indépendamment de la cytokine. L'expression de MPL-W515L dans les expériences de reconstitution de la moelle osseuse de souris, induit un phénotype semblable à la MFP avec thrombocytose, leucocytose, hépato-splénomégalie et myélofibrose, menant à une issue fatale (Pikman et al., 2006).

c. Les mutations de la calréticuline

La deuxième avancée importante dans la compréhension de la pathogenèse des NMP, est la découverte de mutations somatiques dans la calréticuline, chez 20 à 35 % des patients TE ou MFP négatifs pour JAK2-V617F en 2013. Ces mutations sont les plus fréquentes après JAK2-V617F dans les NMP. À ce jour, les deux mutations le plus souvent identifiées sont : une délétion (Del) de 52 paires de bases et une insertion (Ins) de 5 paires de bases toutes deux au niveau de l'exon 9. Ces mutations entraînent un décalage du cadre de lecture qui modifie la région C-terminale de la protéine, impliquant la perte du motif KDEL (lysine-acide aspartique-acide glutamique-leucine) nécessaire à la rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique (Figure 26) (Vainchenker et al., 2016).

Les patients avec ces mutations ont une meilleure survie et peu de risque de thrombose comparé aux patients TE ayant la mutation JAK2-V617F. Les patients TE positifs pour la mutation CALRdel52 développent très souvent une myélofibrose secondaire contrairement à ceux ayant la mutation CALRins5 (Cazzola and Kralovics, 2014). Un phénotype similaire est observé dans les modèles animaux avec les mutations CALRdel52, présentant une thrombocytose qui progresse éventuellement vers une myélofibrose (Marty et al., 2016).

Les mutations de CALR et de JAK2 sont mutuellement exclusives chez les patients atteints de NMP, cependant, les mutations de CALR sont également activatrices de la voie JAK/STAT. En effet, il a été montré que la liaison des mutants CALR au récepteur MPL induit l'activation de ce dernier, permettant le rapprochement et l'activation des kinases JAK2, et ainsi une expansion mégacaryocytaire indépendante de la stimulation du récepteur MPL par la TPO. Toutefois, le mécanisme par lequel les mutations de CALR agissent n'est pas clairement défini (Chachoua et al., 2016).

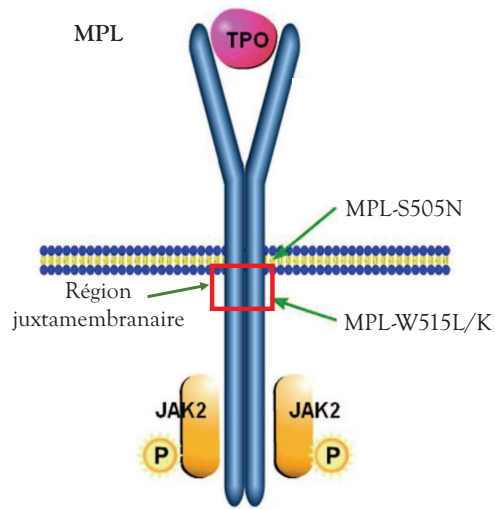


Figure 25 : Représentation schématique des mutations du récepteur MPL

D'après Bennett et collaborateurs (Bennett and Stroncek, 2006)

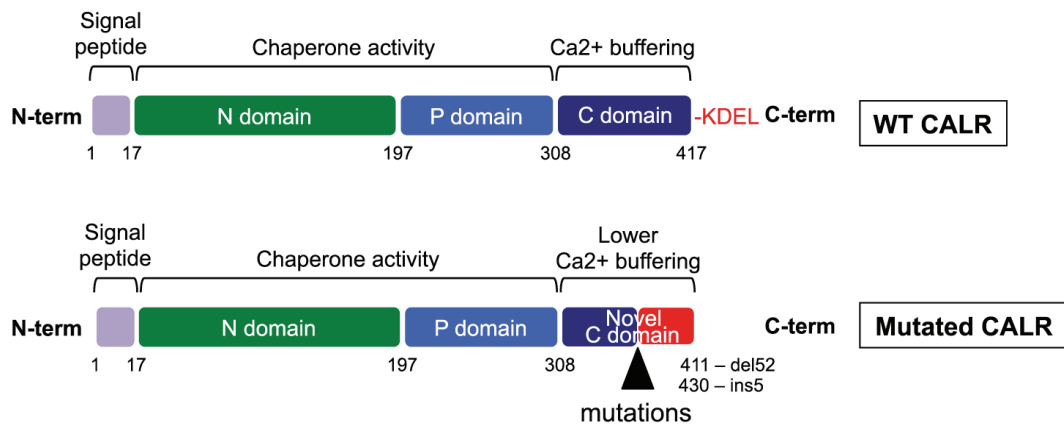


Figure 26 : Représentation schématique des mutations de la calréticuline

D'après Vainchenker et collaborateurs (Vainchenker et al., 2016).

2. Autres mutations identifiées dans les NMP

Des régulateurs négatifs de la voie JAK/STAT, telles que Cbl ou SOCS ont été retrouvés mutés dans les NMP, cependant ces mutations sont très rares. Les mutations faux-sens de Cbl sont associées exclusivement aux patients atteints de MFP. Elles se situent majoritairement dans les domaines RING-finger et linker. Ces mutations entraînent une diminution de la dégradation des protéines de signalisation, dont celle des kinases JAK, permettant ainsi la prolongation du signal. Quant aux mutations des protéines SOCS 1 et 3 elles sont dues à une hyperméthylation ou une délétion de leurs gènes. Elles peuvent être simultanément présentes avec la mutation JAK2-V617F ou MPL-W515K/L chez les patients atteints de NMP (Cleary and Kralovics, 2013).

En plus des mutations sur les protéines de signalisation, les patients atteints de NMP peuvent être porteur de mutations sur les gènes impliqués dans la régulation épigénétique et l'épissage d'ARN, qui ne sont pas exclusives aux NMP (Tableau 7). La fréquence de ces mutations est faible, cependant elles peuvent coopérer avec les mutations des protéines de signalisation afin de promouvoir la myélofibrose ou la transformation leucémique et /ou raccourcir la survie du patient. Les plus fréquentes sont sur les gènes *TET2*, *ASXL1*, *EZH2* et *DNMT3A*. Les mutations du facteur d'épissage *SRSF2* surviennent chez les patients MFP et sont souvent associées aux mutations de *JAK2* et *MPL*, rarement à celles du gène *CALR*. (Tableau 7).

3. Autres facteurs impliqués dans le développement des NMP

En effet, hormis les mutations somatiques acquises, il est évident que d'autres éléments jouent un rôle important dans l'apparition et l'évolution clonale de NMP. Ces facteurs peuvent être la présence de mutations génétiques, y compris la présence des polymorphismes (SNP), des inflammations chroniques et des altérations de la niche hématopoïétique. Tous ces facteurs sont considérés comme facteurs clés impliqués dans la pathogenèse de NMP.

A ce jour, plusieurs SNP prédisposent aux NMP, dont l'haplotype 46/1 sur un locus de *JAK2*. Il fut le premier à être identifié et examiné, non seulement comme un facteur de risque majeur de progression de NMP, mais aussi de l'hématopoïèse clonale de *JAK2-V617F* (Jones et al., 2009 ; Kilpivaara et al., 2009). De manière intéressante, cet haplotype est fortement associé à une réponse défectueuse aux cytokines et au risque accru de développer certaines maladies inflammatoires, comme la maladie de Crohn.

En revanche, les différentes études cliniques, épidémiologiques et biologiques ont suggéré un rôle déterminant de l'inflammation chronique dans l'évolution clonale et la progression de NMP. Dans ce sens, la MFP représente un bon exemple de pathologie où l'inflammation chronique et les altérations dans la niche hématopoïétique jouent un rôle central dans le processus pathologique, comme en témoigne la myélofibrose idiopathique, l'osteomyelosclerose et la néoangiogenèse qui lui sont associés et qui sont ses principaux

éléments de diagnostics. Dans la MFP, des modifications d'interactions entre les HSC /progéniteurs et les cellules stromales dans l'environnement hématopoïétique, seraient à l'origine de la production excessive de cytokines par les cellules hématopoïétiques clonales et par conséquent, de l'activation secondaire de cellules stromales. En effet, l'analyse des cytokines, dans une cohorte de patients atteints de MFP, a montré que le taux élevé de certaines cytokines inflammatoires corrèle avec les symptômes des NMP (Tefferi et al., 2011). En outre, la production excessive de facteurs hématopoïétiques, fibrogéniques, de croissance angiogénique, ainsi que des composants de la matrice extracellulaire, entraîne l'amplification du clone hématopoïétique avec modifications dans sa sensibilité à ces facteurs, conduisant à la stimulation de la myélofibrose (Lataillade et al., 2008). Cependant, une fois que les cellules hématopoïétiques clonales ont marqué le stroma de leur empreinte inflammatoire, celui-ci devient « indépendant » de la stimulation des cellules hématopoïétiques, résultant en une inflammation incontrôlée (Desterke et al., 2015). Ainsi, ces données renforcent le rôle de l'inflammation dans le processus pathologique et suggère que son ciblage peut faire partie des nouvelles approches thérapeutiques pour ces maladies. En effet, les résultats qu'on observe dans le sérum de patients traités avec des inhibiteurs de JAK2 telle qu'une baisse spectaculaire du niveau de nombreuses cytokines pro-inflammatoires appuient cette hypothèse.

C. Mutations et implications de l'adaptateur LNK dans les NMP

Le phénotype des souris déficientes pour l'adaptateur LNK est semblable aux caractéristiques cliniques des patients atteints de NMP. Ces caractéristiques sont distinguées par l'hyperprolifération des progéniteurs myéloïdes (mégacaryocytaires et érythrocytaires) due à une hypersensibilité aux cytokines, par une splénomégalie et par une fibrose (Velazquez et al., 2002). De ce fait, ces souris représentent un modèle animal pertinent pour l'étude des NMP. L'analyse de ces animaux *Lnk*^{-/-} a mis en évidence l'importance de cet adaptateur dans la pathogenèse des NMP.

Des études génétiques et protéiques, dans les cellules dérivées de patients atteints de NMP et des lignées hématopoïétiques, ont été réalisées sur l'adaptateur LNK. D'une part, elles ont mis en évidence la régulation de l'expression de LNK par la voie de JAK2 activée par la TPO. Cette expression est augmentée de façon significative dans les patients NMP, notamment ceux positifs pour JAK2-V617F. Ces résultats ont également suggéré une régulation bidirectionnelle différente entre LNK et les deux formes de JAK2 qui pourrait jouer un rôle important dans le développement de ces pathologies (Baran-Marszak et al., 2010). D'autre part, ces études ont démontré que l'adaptateur LNK est capable de s'associer via son domaine SH2 aux protéines oncogéniques MPL-W515L et JAK2-V617F. Cette association aboutit à l'inhibition des voies de signalisation en aval, telles que celles impliquant STAT3/5, MAPK et AKT. L'inhibition de ces voies mènent à la diminution de la prolifération des cellules exprimant JAK2-V617F ou MPL-

W515L (Baran-Marszak et al., 2010; Bersenev et al., 2008 ; Gery et al., 2009a ; Gery et al., 2007).

Par ailleurs, l'analyse moléculaire de l'interaction entre LNK et les kinases JAK2-WT et JAK2-V617F a mis en évidence l'existence d'un nouveau site de liaison entre la région N-terminale incluant le domaine PH (NPH) de LNK et ces formes de JAK2. Toutefois, il semblerait que cette nouvelle interaction se fait de manière plus importante avec JAK2-V617F, suggérant une éventuelle utilisation de LNK comme inhibiteur spécifique de cette forme oncogénique de JAK2. (Baran-Marszak et al., 2010).

L'ensemble de ces études ont suggéré que LNK joue un rôle inhibiteur important dans le développement de ces pathologies. Cependant, l'identification des mutations de LNK chez ces patients, a confirmé l'importance de cet adaptateur dans la physiopathologie des NMP.

Afin d'éclaircir le rôle de LNK dans les NMP, l'analyse génétique de cet adaptateur a été réalisée par différents groupes dans les cellules des patients atteints de ces pathologies. Différentes mutations de LNK ont été identifiées, dans les NMP (PV, TE et MFP) négatifs et positifs pour JAK2-V617F. Ces mutations somatiques sont présentes à faible fréquence (<5 %) et sont donc considérées comme des événements rares. Cependant, certaines mutations ont été identifiées dans des transformations leucémiques post-NMP (LMA) à une fréquence plus élevée (13 %), ainsi que dans des érythrocytoses idiopathiques (EI) JAK2-négatifs (25%) (Tableau 8).

Les premières mutations de LNK ont été mises en évidence chez deux patients TE et MFP négatifs pour JAK2-V617F dans une cohorte de 33 patients. Ces mutations sont localisées sur l'exon 2 codant pour le domaine PH de LNK. Il s'agit d'une délétion de 5 paires de bases et une mutation faux-sens remplaçant l'acide glutamique (E) en position 208 par une glutamine (Q), E208Q (Oh et al., 2010). Des mutations de LNK ont ensuite été rapportées dans tous les domaines et régions de l'adaptateur (Figure 27) (Baran-Marszak et al., 2010 ; Ha and Jeon, 2011 ; Hurtado et al., 2011 ; Lasho et al., 2010 ; Spolverini et al., 2013).

Cependant, l'implication fonctionnelle et le mécanisme d'action des mutations de LNK ne sont pas complètement définis à ce jour. Seules les mutations situées dans le domaine PH de LNK ont été analysées dans les cellules dérivées de patients atteints de NMP ou dans des lignées hématopoïétiques exprimant ces formes mutées de LNK. Ces études ont montré que certaines mutations du domaine PH de LNK, telle que la mutation LNK-E208Q, inhibent partiellement la prolifération cellulaire activée par la TPO ou l'EPO dans un contexte JAK2-WT (Koren-Michowitz et al., 2013; Oh et al., 2010). Cependant, lorsque la forme mutée LNK-E208Q est exprimée dans des cellules positives pour JAK2-V617F, elle ne parvient plus à exercer sa fonction inhibitrice (Koren-Michowitz et al., 2013) (Jungalee, A et al, manuscrit en préparation).

De manière intéressante, la mutation LNK-E208Q a été récemment identifiée dans de cas familiaux de NMP, confirmant l'existence des mutations germinales de LNK dans ces pathologies. Cependant, cette mutation à elle-seule, ne confère pas un phénotype NMP. De ce fait, ces résultats suggèrent que LNK-E208Q coopère avec les mutations déterminantes du

phénotype NMP, telles JAK2-V617F, afin d'induire un phénotype pathologique chez les NMP (Loscocco et al., 2016; Rumi et al., 2016).

D'autre part, plusieurs études récentes d'association pangénomique (Genome-Wide Association Studies, ou GWAS) ont identifié le « non-synonymous Single Nucleotide Polymorphism » (nsSNP) rs3184504 du gène *LNK*. Il est associé à des maladies inflammatoires (maladie cœliaque, polyarthrite rhumatoïde, diabète de type 1 et sclérose en plaque), à différents dérèglements biologiques (taux d'éosinophiles et de plaquettes élevés) et à des maladies vasculaires (hypertension artérielle et pathologies artérielles coronaires). Ce nsSNP cause la substitution d'une cytosine (allèle C) en position 784 par une thymine (allèle T) dans l'exon 2 du gène *LNK*, ce qui se traduit au niveau de la protéine, par le remplacement d'une arginine par un tryptophane en position 262 (R262W) dans le domaine PH de LNK.

Dans ce contexte, nos études ont montré que le SNP *LNK* (allèle T) est également associé aux NMP. En effet, ce polymorphisme est plus fréquemment retrouvé chez les patients développant une MFP que ceux atteints de TE. Par ailleurs, nos résultats ont également montré que ce polymorphisme est plus fréquent chez les patients atteints de NMP porteurs de la mutation JAK2-V617F. Ainsi, ces données suggèrent l'implication de la protéine LNK-R262W (allèle T) dans le développement de NMP, en synergie avec la forme mutée de JAK2 (Lesteven et al., 2014).

De plus, d'autres polymorphismes dans le gène *LNK* ont été identifiés avec une fréquence moins importante, chez des patients atteints de NMP. Ce sont le V402M, A300V, R415H, P242S et A536T, ainsi que le SNP E400K identifié chez des patients atteints d'une érythrocytose idiopathique (Chen et al., 2016 ; Ha and Jeon, 2011 ; McMullin et al., 2011).

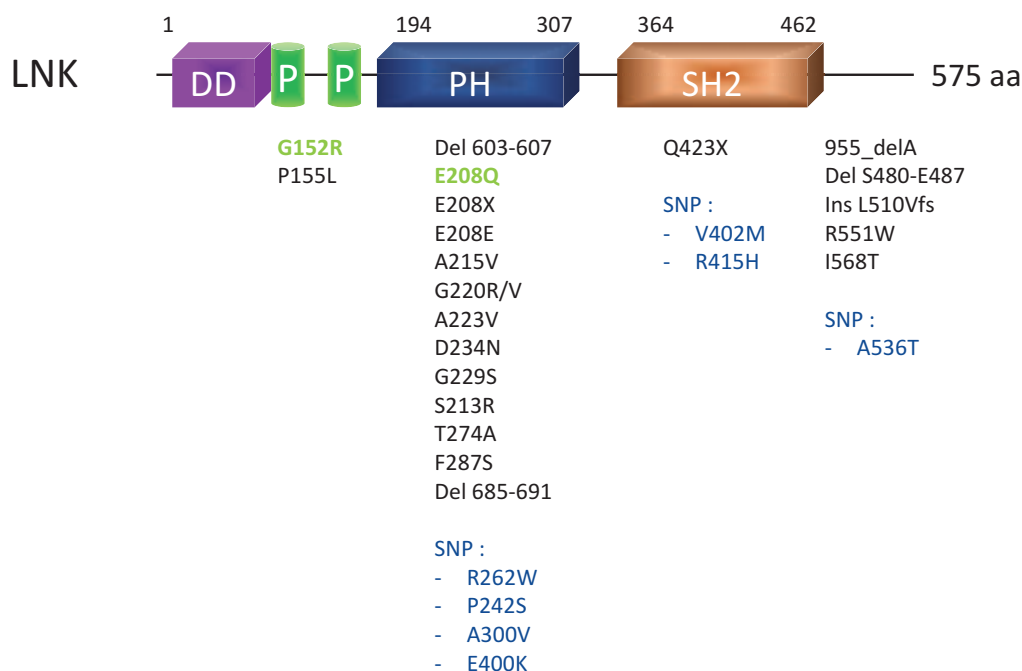


Figure 27 : Localisation des mutations identifiées dans les NMP Ph et LMA de la protéine LNK

Abréviations : domaine de dimérisation (DD), domaine d'homologie à la pleckstrine (PH), domaine d'homologie à Src2 (SH2), motif riche en proline (P) ; délétion (Del) ; insertion (Ins) ; « single nucleotide polymorphisme » (SNP) ; décalage du cadre de lecture (fs) ; les chiffres au-dessus des domaines correspondent au premier et au dernier acide aminé du domaine chez l'homme. X représente un codon STOP. Acide aminé (aa)

Tableau 8 : Mutations de LNK identifiées dans les NMP Ph et LMA

Région	Mutation	Qualification	Pathologie	JAK2-V617F	Références
Nter	G152R	Faux-sens	TE	Nég	(Baran-Marszak et al., 2010)
	P155L	Faux-sens	EI	Nég	(Spolverini et al., 2013)
PH	Del 5pb 603_607delGCGCT	Non-sens	MFP	Nég	(Oh et al., 2010)
	E208Q	Faux-sens	TE/EI	Nég	(Oh et al., 2010) (Spolverini et al., 2013)
	E208X	Non-sens	EI	Nég	(Lasho et al., 2010)
	A215V	Faux-sens	EI/MFP/LMA	Nég	(Lasho et al., 2010) (Pardanani et al., 2010)
	G220R/V	Faux-sens	MFP	Pos/Nég	(Pardanani et al., 2010)
	A223V	Faux-sens	MFP/LMA	Nég	(Pardanani et al., 2010)
	D234N	Faux-sens	MFP/LMA	Nég	(Pardanani et al., 2010)
	G229S	Faux sens	MFP /LMA	Pos	(Pardanani et al., 2010)
	E208E	Sens	PV/LMA	Pos	(Pardanani et al., 2010)
	S213R	Faux-sens	EI	Nég	(Spolverini et al., 2013)
	T274A	Faux-sens	EI	Nég	(Spolverini et al., 2013)
	F287S	Faux-sens	PV	Pos	(Hurtado et al., 2011)
	SNP 784 T>C rs3184504 R262W	Faux-sens	TE/ MFP	Pos et Nég	(Lesteven et al., 2014) (Ha and Jeon, 2011)
	SNP 724 C>T rs78894077 P242S	Faux-sens	NMP	Nd	(Ha and Jeon, 2011) (Chen et al., 2016)
	SNP 899C>T A300V	Faux-sens	TE/ PV/ LMC	Pos et Nég	(Chen et al., 2016)

Suite tableau 8					
PH C-ter	685- 691_delGGCCCCG 955_delA	Non-sens	PV/LMA EI	Pos	(Pardanani et al., 2010) (Lasho et al., 2011)
SH2	rs72650673 1198G>A E400K	Faux-sens	EI	Nég	(McMullin et al., 2011)
	SNP 1204G>A rs755796482 V402M	Faux-sens	TE/MFP	Pos	(Chen et al., 2016)
	SNP 1244G>A R415H	Faux-sens	PV	Pos	(Chen et al., 2016)
	Q423X	Non-sens	TE	Pos	(Ha and Jeon, 2011)
C-ter	Del S480-E487	Nd	MFP	Nég	(Hurtado et al., 2011)
	Ins L510VfsX35(+) L510F	Nd	TE	Nég	(Hurtado et al., 2011)
	SNP 1606G>A A536T	Faux-sens	PV	Nd	(Ha and Jeon, 2011)
	R551W	Faux-sens	MFP	Pos	(Ha and Jeon, 2011)
	I568T	Faux-sens	PV	Pos	Ha, 2011 #176}

Abréviations : délétion (Del) ; insertion (Ins) ; « Single Nucleotide Polymorphisme » (SNP) (représentés en bleu) ; décalage du cadre de lecture (fs) ; X représente un codon STOP ; Les mutations identifiées et/ou étudiées, par notre équipe, sont écrites en vert.

II. Leucémie Lymphoblastique Aiguë de précurseurs B

De manière intéressante, des mutations dans le gène de *LNK* ont été également retrouvées dans des pathologies lymphoprolifératives. En particulier, une mutation homozygote germinale, provoquant un décalage du cadre de lecture (fs), LNK-D231fs, a été mise en évidence chez les patients atteints de Leucémie Lymphoblastique Aiguë de précurseurs B. Cette mutation située dans le domaine PH entraîne la perte d'expression de LNK, résultant ainsi en l'augmentation de l'activation de la voie JAK2/STAT3, la prolifération de cellules lymphoïdes et le développement accéléré d'une leucémie dans un modèle murin de LLA induite par NOTCH1 (Perez-Garcia et al., 2013). Par la suite, d'autres mutations de LNK ont été aussi identifiées chez les patients atteints de LLA-B se situant dans les domaines PH et SH2 (Figure 28) (Perez-Garcia et al., 2013 ; Roberts et al., 2014).

D'autre part, LLA-B a également été associée à des mutations ponctuelles, suppressions ou insertions dans le domaine pseudokinase de JAK2 (Figure 23). Il s'agit d'une mutation de l'exon 14 (L611S) et des mutations récurrentes dans l'exon 16 dans environ 18 % des patients LLA-B associées aux néoplasmes Down. Cette mutation concerne le résidu arginine 683 (R683G, R683S) et conduit à l'activation constitutive de JAK2 et STAT5 et la croissance cellulaire indépendamment de la stimulation par cytokine (Kearney et al., 2009).

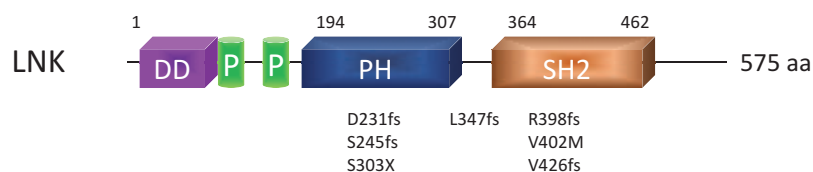


Figure 28 : Mutations de *LNK* dans les LLA-B

Décalage du cadre de lecture (fs) ; Codon STOP (X) ; Acide aminé (aa)

III. Oncogenèse

Les mutations de LNK ne semblent pas être des événements exclusifs, car elles ont été également retrouvées avec des mutations dans d'autres gènes, tels *JAK2*, *TET2* et *CBL*. (Lasho et al., 2011; Pardanani et al., 2010). Ces résultats suggèrent que les mutations de LNK induisent un phénotype NMP qui peut dépendre de différents paramètres, telle la présence d'autres mutations.

Dans ce contexte, l'équipe de Bersenev a analysé le rôle de LNK *in vivo* dans un modèle murin exprimant, soit *JAK2-V617F*, soit la fusion des protéines TEL et *JAK2* qui induit une activation constitutive de la kinase. Ces animaux présentent une expansion anormale des progéniteurs myéloïdes et des précurseurs immatures *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, ils ont mis en évidence que l'absence de LNK permet à ces mutations de développer plus rapidement et agressivement les phénotypes pathologiques des NMP. Ceci est dû à une augmentation de la signalisation dépendante des cytokines et donc la capacité de *JAK2* à stimuler l'expansion du lignage myéloïde (Bersenev et al., 2010).

Par ailleurs, les souris âgées *Lnk*^{-/-} développent spontanément un phénotype semblable aux caractéristiques clinique des patients atteints de leucémie myéloïde chronique, suggérant un rôle de LNK dans l'expansion myéloïde *in vivo*. Toutefois, cette hyper-prolifération cellulaire myéloïde ne parvient pas à déclencher de crises blastiques dans ces souris comme c'est le cas dans la pathologie humaine. Ces données renforcent l'hypothèse dans laquelle LNK nécessite d'autres événements oncogéniques pour favoriser la transformation maligne (Gery et al., 2009b).

D'autre part, LNK est capable de s'associer également avec certains oncogènes de récepteurs à activité tyrosines-kinases, tels que *KIT-D816V*, *TEL-PDGFR*, *FIP1L1-PDGFR* et *FLT3-ITD*. L'interaction de LNK avec ces protéines mutées permet d'inhiber la prolifération induite par ces oncogènes (Gery et al., 2009b ; Gueller et al., 2011 ; Lin et al., 2012). Ces résultats mettent en évidence le rôle important de LNK dans ces hémopathies prolifératives, ce qui suggère la possibilité d'utiliser l'adaptateur à des fins thérapeutiques.

Enfin, le rôle de LNK dans les tumeurs solides n'a pas réellement été exploré en détail. Cependant, il a été rapporté qu'une expression élevée de LNK dans le cancer ovarien, rend les cellules résistantes à l'apoptose et induit la formation de tumeurs de grande taille dans un modèle de xénotgreffe murin. Ceci se traduit au niveau moléculaire par l'augmentation de la phosphorylation des protéines *AKT* et *MAPK*, de l'adhésion cellulaire, mais aussi par une diminution de taille et de la migration de ces cellules. Contrairement à son rôle d'inhibiteur dans les pathologies hématopoïétiques, l'inhibition de LNK, dans ces cellules, diminue leur prolifération *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, ces données suggèrent que LNK est un régulateur positif de la transduction du signal dans ce contexte, favorisant la croissance tumorale (Ding et al., 2015).

IV. Maladies inflammatoires et vasculaires

Plusieurs données ont démontré l'implication de l'adaptateur LNK dans certains processus inflammatoires. En effet, les souris *Lnk*^{-/-} ont une prolifération accrue de cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, notamment mégacaryocytaire, une hématopoïèse extramedullaire et une fibrose importante. De plus, les cellules dérivées des souris *Lnk*^{-/-} ont une activation anormale des cellules inflammatoires (mastocytes, mégacaryocytes/plaquettes et cellules endothéliales). Enfin, l'identification du SNP *LNK* (allèle T) a fortement été associée à des maladies inflammatoires ou vasculaires et aux NMP (Alcina et al., 2010; Gudbjartsson et al., 2009). Cependant, le rôle fonctionnel du SNP *LNK* dans la prédisposition et le développement de ces maladies n'est pas encore clairement défini.

Dans cette optique, certaines études menées sur le SNP *LNK* ont suggéré que l'adaptateur LNK est impliqué dans la maladie cœliaque en jouant un rôle protecteur contre les infections bactériennes de l'intestin (Hunt et al., 2008; Zhernakova et al., 2010) et dans le diabète de type I en régulant les réponses inflammatoires et en prévenant l'activation de lymphocytes auto-immun (Lavrikova et al., 2011).

De plus, ce SNP a aussi été associé à des maladies vasculaires et d'hypertension. Grâce à l'utilisation de modèles de rat, le SNP *LNK* a été démontré comme étant un déterminant génétique important de l'inflammation et de la fibrose cardiaque dans l'infarctus du myocarde (Flister et al., 2015). D'autre part, l'hypertension est un facteur de risque important pour les maladies cardiovasculaires, ainsi que les maladies chroniques rénales. L'analyse des modèles animaux a donc montré le rôle important de LNK dans la régulation de la tension artérielle et l'inflammation rénale, via la modulation des voies de signalisation pro-inflammatoires dans des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules endothéliales (Blass et al., 2016 ; Dale and Madhur, 2016).

L'ensemble de ces données suggèrent donc que le SNP *LNK* est un facteur risque important dans plusieurs pathologies inflammatoires chroniques.

CHAPITRE V :

APPROCHES

THÉRAPEUTIQUES

I. Thérapies utilisées dans les NMP Ph

Il n'existe actuellement pas de traitement curatif des NMP hormis la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, après conditionnement myéloablatif.

Plusieurs inhibiteurs des kinases JAK sont actuellement en essais cliniques. Ce sont tous des inhibiteurs de type 1 qui miment l'adénosine triphosphate (ATP) en se liant à la kinase sous sa forme active. Les premiers essais cliniques ont été axés sur les patients ayant un risque intermédiaire ou élevé de développer une myélofibrose, en raison de la gravité de leurs symptômes. Cependant, ces molécules ont montré peu d'efficacité clinique et aucune réelle amélioration de survie.

Parmi les inhibiteurs de JAK testés, le Ruxolitinib est le seul à avoir obtenu des résultats satisfaisants durant la phase III des deux essais cliniques clés, COMFORT (COntrolled MyeloFibrosis study with ORal JAK inhibitor Treatment) I et II. De ce fait, il a été accepté par « US Food and Drug Administration (FDA) en 2011 et par la Commission européenne en 2012 (Harrison et al., 2012 ; Verstovsek et al., 2012). Le Ruxolitinib est un inhibiteur de JAK1 et JAK2, capable d'induire une rapide réduction de la taille de la rate, d'environ 30%, une réduction durable des symptômes liés à la myélofibrose et une amélioration de la qualité de vie des patients. Toutefois, ces effets sont dus à la réduction du taux de cytokines proinflammatoires plutôt qu'à la diminution de la charge allélique en *JAK2-V617F*. D'autres inhibiteurs ont été testés tel que le Fedratinib, ciblant préférentiellement JAK2. Il induit une réduction de la taille de la rate, de la charge allélique en *JAK2-V617F* et une amélioration des symptômes liés à la MFP. Le Lestauritinib, le CYT387 et le pacritinib ont aussi des effets plus ou moins importants sur la réduction de la taille de la rate et l'amélioration de la qualité de vie des patients (Roskoski, 2016).

Cependant, JAK2 est une cible thérapeutique particulière, du fait de son importance dans l'hématopoïèse, notamment pour la production d'érythrocytes et de plaquettes. De ce fait, les thérapies actuelles doivent être utilisées avec précaution afin d'éviter des anémies ou des thrombocytopenies. En effet, ces inhibiteurs, dont le Ruxolitinib, ont des effets secondaires plus ou moins importants comme la myélosuppression. Les autres inhibiteurs peuvent induire également des encéphalopathies, des anémies, des diarrhées et des nausées (Roskoski, 2016).

En outre, les inhibiteurs de JAK ont un effet modéré sur la réduction de la charge allélique en *JAK2-V617F*, sur la fibrose et des symptômes de la MFP. Toutefois, il a été montré chez la souris que les inhibiteurs de JAK ne sont pas capables de réduire le nombre de cellules initiatrices des NMP ce qui signifie qu'après traitement, la maladie persiste. C'est ce que l'on observe chez les patients lors de l'arrêt du traitement, confirmant que ces traitements ne sont pas curatifs. De plus, l'exposition chronique aux inhibiteurs de JAK conduit au développement des cellules persistantes, probablement dû au fait que JAK2 est activée via la formation d'hétérodimères avec d'autres JAKs, capables de transactiver JAK2. Ces cellules restent sensibles à JAK2. De ce fait, l'utilisation des inhibiteurs du type 2, ciblant et stabilisant la forme inactive

de la kinase, permettrait d'éviter ce phénomène. Cependant, aucun de ces inhibiteurs ne sont utilisés en essai clinique.

Ainsi, l'ensemble de ces données démontre l'importance du développement de nouveaux traitements, visant à inhiber spécifiquement JAK2-V617F. Néanmoins, d'autres alternatives sont à présent envisagées. Celles-ci incluent le ciblage indirect de JAK2-V617F ou des effecteurs de signalisation en aval de la voie JAK2, qui peuvent être importants pour le développement clonal des cellules exprimant JAK2 oncogénique. Une des options possibles est l'association d'inhibiteurs de type 1 avec des traitements conduisant à la dégradation de JAK2 comme les inhibiteurs de HSP90 ou des inhibiteurs de l'histone désacétylase (HDAC) (Pasquier et al., 2014). En outre, l'interféron alpha (IFN α) est l'une des rares molécules ciblant le clone JAK2-V617F. Cependant, son mécanisme d'action précis sur cette forme mutée de JAK2, reste inconnu à ce jour (Figure 29) (Kiladjian et al., 2008).

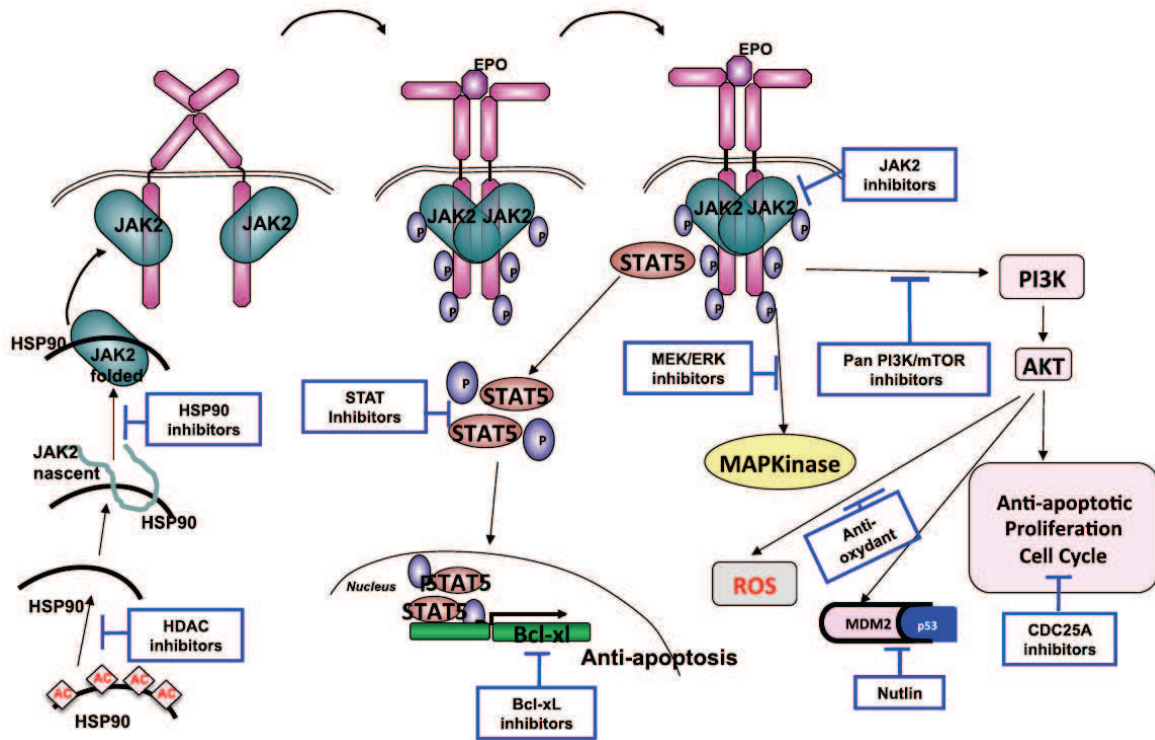


Figure 29 : Les différents inhibiteurs utilisés dans le traitement des NMP

L'activation de JAK2, par la liaison de la cytokine à son récepteur, induit l'activation de plusieurs protéines de signalisation, telles que STAT, PI3K, MAPK/ERK. Ainsi des inhibiteurs de ces protéines ont été développés. D'après Pasquier et collaborateurs (Pasquier et al., 2014)

II. Thérapies envisageables par des peptides pénétrants

Un des problèmes à l'utilisation thérapeutique de molécules spécifiques est la délivrance efficace de celles-ci à l'intérieur de la cellule cible. Plusieurs approches ont été développées à cet effet tels que des bactériophages, des exosomes, des liposomes cationiques ou encore des particules de virus vecteurs. Toutefois, ces techniques présentent plus d'inconvénients que d'avantages. En effet, malgré leur potentiel, ils peuvent déclencher des réponses immunologiques, des mutations ou bien une toxicité inflammatoire. De plus, ils sont aussi limités par la nature et la taille de leur cargo. Ces approches sont donc généralement utilisées pour le traitement de maladies mortelles pour lesquelles les avantages sont plus importants que les risques (Seow and Wood, 2009). De ce fait, d'autres stratégies ont été développées dont l'utilisation de peptides pénétrants (CPP). L'un des avantages de ces CPP est la possibilité de les combiner à des peptides visant une cible spécifique, créant ainsi un système de délivrance sélectif.

Les CPP sont des peptides d'environ 5 à 35 acides aminés, ils sont capables de traverser les membranes plasmiques avec un faible taux de toxicité et en transportant un cargo. Ce cargo peut être de différentes natures, des nanoparticules, des peptides, des protéines, des oligonucléotides anti-sens, des ARN messagers silencieux ou encore de l'ADN double brin. Afin de réaliser des thérapies ciblées *in vivo* et *in vitro*, le développement des CPP passe par plusieurs étapes. Parmi celles-ci se trouvent l'étude des propriétés de la cellule cible, du cargo à transporter et du mécanisme d'entrée du CPP afin de déterminer le CPP avec une capacité d'internalisation optimale.

A. Les différents types de CPP

Il existe plusieurs types de CPP classés soit par leur origine soit par leurs propriétés physico-chimique. Selon le classement par rapport à leur origine, il a été défini trois groupes. Le premier comporte les CPP dérivés de protéines tel que le CPP dérivé de la protéine « Trans-Activator of Transcription » (TAT) du virus d'immunodéficience humaine (HIV-1), correspondant à la plus petite séquence protéique capable de traverser la membrane plasmique. Ce groupe contient aussi les CPP pénétratine et pVEC, respectivement dérivés de Antennapedia et de la cadhérine. Le second groupe comprend les CPP chimériques, ils sont composés par la fusion de séquences de deux protéines naturelles, tel que le transportane. Enfin le troisième groupe représentent les CPP synthétiques basés sur les caractéristiques physico-chimique de la structure étudiée comme les polyarginines (Tableau 9) (Bechara and Sagan, 2013).

La classification par leurs propriétés physico-chimiques permet aussi de diviser les CPP en trois groupes : cationiques, hydrophobes ou amphiphiles. Les CPP cationiques sont chargés positivement tels que les peptides TAT ou la pénétratine, grâce aux résidus lysine et arginine dont ils sont composés. Les CPP hydrophobes sont eux composés de résidus non-polaires.

Quant aux CPP amphiphiles, ils sont composés d'une région d'acides aminés polaires et d'une région d'acides aminés non-polaires (Tableau 10).

Les cargos transportés peuvent être liés de manière covalente ou non aux CPP. Les liaisons covalentes se font par liaison peptidique, c'est le cas des CPP-TAT, par une boucle de thiazolidine ou encore par des ponts disulfures, tandis que les liaisons non covalentes se font par la liaison de molécules telles que la streptavidine qui peut être liée au cargo et la biotine qui serait liée au CPP (Figure 30).

Tableau 9 : Classement des CPP les plus utilisés selon leurs origines

D'après Bechara et collaborateurs (Bechara and Sagan, 2013)

Peptide	Source	Séquence
<i>Dérivés de protéines</i>		
Pénétratine	Antennapedia	Voir tableau 10
Tat	Protéine Tat du HIV	Voir tableau 10
pVEC	Cadhérine	LLIILRRRIRKQAHHSK
Oct4	Oct4	Voir tableau 10
WT1-pTj	« Wilms tumor protein 1 »	Voir tableau 10
DPV3	Protéine de liaison à l'Héparine	Voir tableau 10
VP22	Protéine structurale du virus de l'Herpès	Voir tableau 10
KFGF	« Kaposi fibroblast growth factor »	Voir tableau 10
Intégrine $\beta 3$	Intégrine $\beta 3$	Voir tableau 10
C105Y	$\alpha 1$ -Antitrypsine	Voir tableau 10
<i>Chimérique</i>		
Transportane	Galanine et Mastoparane	Voir tableau 10
MPG	HIV-gp41/SV40 T-antigène	
Pep-1	HIV-reverse transcriptase/SV40 T-antigène	
<i>Synthétique</i>		
Polyarginine	Basé sur le peptide Tat	Voir tableau 10
MAP	<i>De novo</i>	Voir tableau 10
R ₆ W ₃	Basé sur le peptide pénétratine	RRWWRRWRR

Tableau 10 : Classement des CPP les plus utilisés selon leurs propriétés physico-chimiques

D'après Ramsey et collaborateurs (Ramsey and Flynn, 2015).

Peptide	Source	Séquence
<i>Cationique</i>		
TAT (48-60)	Protéine HIV TAT	GRKKRRQRRRPPQ
Pénétratine	Antennapedia	RQIKIWFQNRRMKWKK
Polyarginine	Synthétique	RRRRn
Oct4	Protéine Oct4	DVVRVWFCNRRQKGKR
WT1-pTj	Wilms tumor protein 1	KDCERRFSRSDQLKRHQRRTGV KPFQ
DPV3	Protéine de liaison à l'Héparine	RKKRRRESRKKRRRES
<i>Amphiphile</i>		
Transportane	Galanine et Mastoparane	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAK KIL
MAP	Synthétique	KLALKLALKALKAALKLA
VP22	Protéine structurale du virus de l'Herpès	DAATATRGRSAASRPTERPRAPAR SASRRRPVE
Pep1	SV 40 NLS et domaine hydrophobe	KETWWETWWTEWSQPKKRKY
<i>Hydrophobe</i>		
KFGF	Kaposi fibroblast growth factor	AAVLLPVLLAAP
Peptide Intégrine $\beta 3$	Intégrine $\beta 3$	VTVLALGALAGVGVG
C105Y	$\alpha 1$ -Antitrypsine	PFVYLI
TP2	Synthétique	PLIYLRLLRGQF

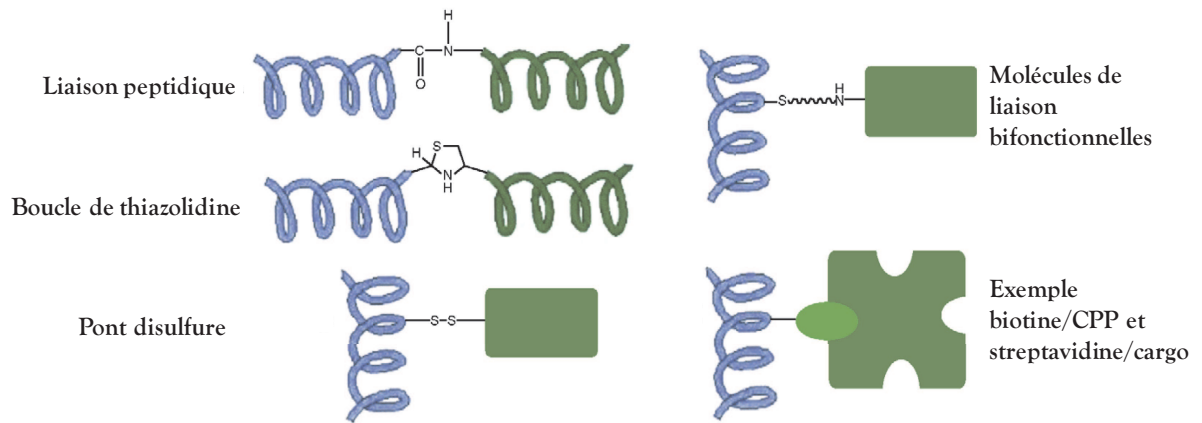


Figure 30 : Liaison des CPP aux cargos

Le CPP est représenté en bleu et le cargo en vert. Les liaisons peptidiques, les boucles de thiazolidine et les ponts disulfures sont des liaisons covalentes. La streptavidine se lie de manière non covalente à la biotine. D'après Zorko et collaborateurs (Zorko and Langel, 2005)

B. Entrée des CPP dans la cellule

Plusieurs méthodes ont été mises en place pour l'évaluation de l'entrée des CPP dans la cellule telles que des méthodes de fluorescence où le CPP est lié à un fluorochrome ou par détection de l'activité biologique du cargo. Toutefois, *in vitro*, ces méthodes nécessitent la fixation de cellules ce qui peut créer des artefacts dans l'analyse des signaux. De plus, la liaison entre le fluorochrome et le CPP peut modifier les propriétés physico-chimique du CPP. La structure secondaire des CPP peut aussi être modifiée par son interaction avec la membrane plasmique. Ainsi, les essais fonctionnels sont plus appropriés lors d'applications thérapeutiques et biotechnologique puisqu'ils ne nécessitent pas la fixation de cellules. Cependant, plusieurs paramètres doivent être définis tels que l'affinité du cargo pour sa cible intracellulaire et la capacité de modification de la cible par le cargo ou l'inverse selon le contexte (Bechara and Sagan, 2013).

L'internalisation des CPP, notamment ceux avec une charge positive élevée, se fait par simple absorption à la surface des cellules grâce aux groupements chargés négativement. Elle se fait généralement par endocytose, certains modèles proposent l'internalisation des CPP par translocation directe de la membrane plasmique. Cette internalisation a été définie comme étant généralement indépendante des récepteurs membranaires. Toutefois, des études ont montré que les protéoglycanes héparane sulfate, chargés négativement, jouent un rôle important dans l'interaction entre le CPP et la membrane. En effet, les peptides TAT, pénétратine et polyarginine sont capables d'interagir avec ces protéoglycanes, ce qui stimule leur internalisation (Farkhani et al., 2014).

Afin de déterminer quelle voie d'endocytose est utilisée pour l'internalisation des CPP, des groupes de recherches ont utilisé des inhibiteurs des voies d'endocytose et mesuré la capacité d'internalisation des CPP. Toutefois, il semble qu'un même CPP peut utiliser plusieurs voies d'endocytose. Le mécanisme et l'efficacité d'internalisation des CPP dépendent donc de la nature des CPP et des cargos mais aussi de leur taille. En effet, il a été montré *in vitro*, que les CPP-TAT couplés à un long cargo n'arrivent pas à s'échapper des endosomes. Cependant leur couplage à des petits cargos, qui permettent leur échappement et leur distribution dans le cytoplasme aux sites spécifiques. De plus, la température, le pH et la concentration des molécules jouent un rôle dans l'internalisation des CPP. Il a aussi été montré que les résidus arginine des CPP contiennent des groupements guanidine facilitant l'interaction avec la membrane. Les résidus lysine, n'en possédant pas, ils sont moins efficaces à l'internalisation des CPP.

L'endocytose est caractérisée par deux étapes, la première étant l'entrée du CPP dans la cellule et la deuxième est l'échappement endosomale de ce CPP. Les résidus du CPP, chargés positivement, se lient aux phospholipides de la membrane plasmique, chargée négativement. Ceci permet l'entrée du CPP dans la cellule soit par macropinocytose en réarrangeant les filaments d'actine soit par invagination de la membrane par l'intermédiaire de clathrine ou de

calvéoline ou alors indépendamment de ces deux molécules. Afin d'éviter la dégradation endosomale des CPP, des additifs sont rajoutés au milieu de culture *in vitro*, tels que la chloroquine, empêchant l'acidification des endosomes et facilitant l'échappement endosomale des CPP. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) peut aussi être ajouté pour augmenter la perméabilité de la membrane plasmique (Figure 31). Cependant, les mécanismes d'échappement *in vivo* reste encore peu clairs (Skotland et al., 2015).

Différents modèles de la translocation directe de la membrane plasmique par les CPP ont été proposés tels que le recouvrement de la membrane par les CPP, la formation de micelle inversée ou encore la translocation adaptative. Le recouvrement de la membrane plasmique, par les CPP, déstabilise la bicouche lipidique entraînant la formation de pores et permettant l'entrée du CPP dans la cellule. Ceci est l'un des mécanismes qu'utilise le CPP-TAT. En premier lieu, les résidus arginine et lysine du peptide TAT se lient aux phospholipides de la membrane cellulaire. La deuxième étape est l'accumulation de CPP-TAT à la surface de la cellule, entraînant un amincissement de la bicouche lipidique. Puis l'attraction entre les résidus arginine et lysine du peptide TAT et les groupements phosphates de la bicouche lipidique permettent aux CPP-TAT de commencer leur entrée dans la bicouche. Enfin, lorsque le pore est formé, les CPP-TAT traverse la membrane par diffusion via ce pore qui se refermera ensuite (Figure 32) (Herce and Garcia, 2007).

La translocation membranaire par micelle inversée a été proposée pour expliquer l'internalisation de la pénétratine. Les résidus positivement chargés se lient aux phospholipides de la membrane, créant une invagination membranaire, puis le CPP est libéré par inversion de micelle (Figure 33) (Raucher and Ryu, 2015).

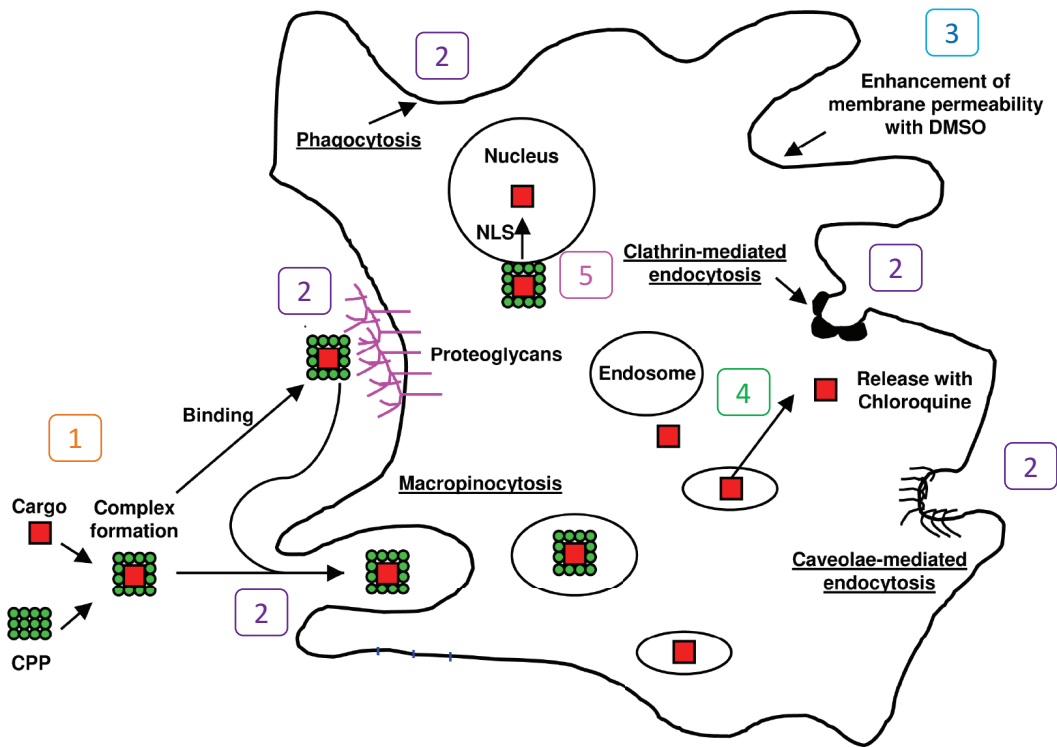


Figure 31 : Voies d'endocytose des CPP

Après la formation du complexe CPP/cargo (1), le complexe peut entrer dans la cellule par plusieurs voies (2) (macropinocytose, phagocytose, liaison aux protéoglycans de la membrane, endocytose dépendante de la clathrine ou de la calvéoline). Son internalisation peut être facilitée par des additifs, tel que le DMSO (3). Une fois dans la cellule, le complexe doit échapper à la dégradation endosomale, ce qui peut être facilité par la chloroquine (4). Certains de ces CPP peuvent aussi délivrer leur cargo dans le noyau des cellules grâce à une séquence de localisation nucléaire (NLS) (5). D'après le site <http://www.jenabioscience.com>

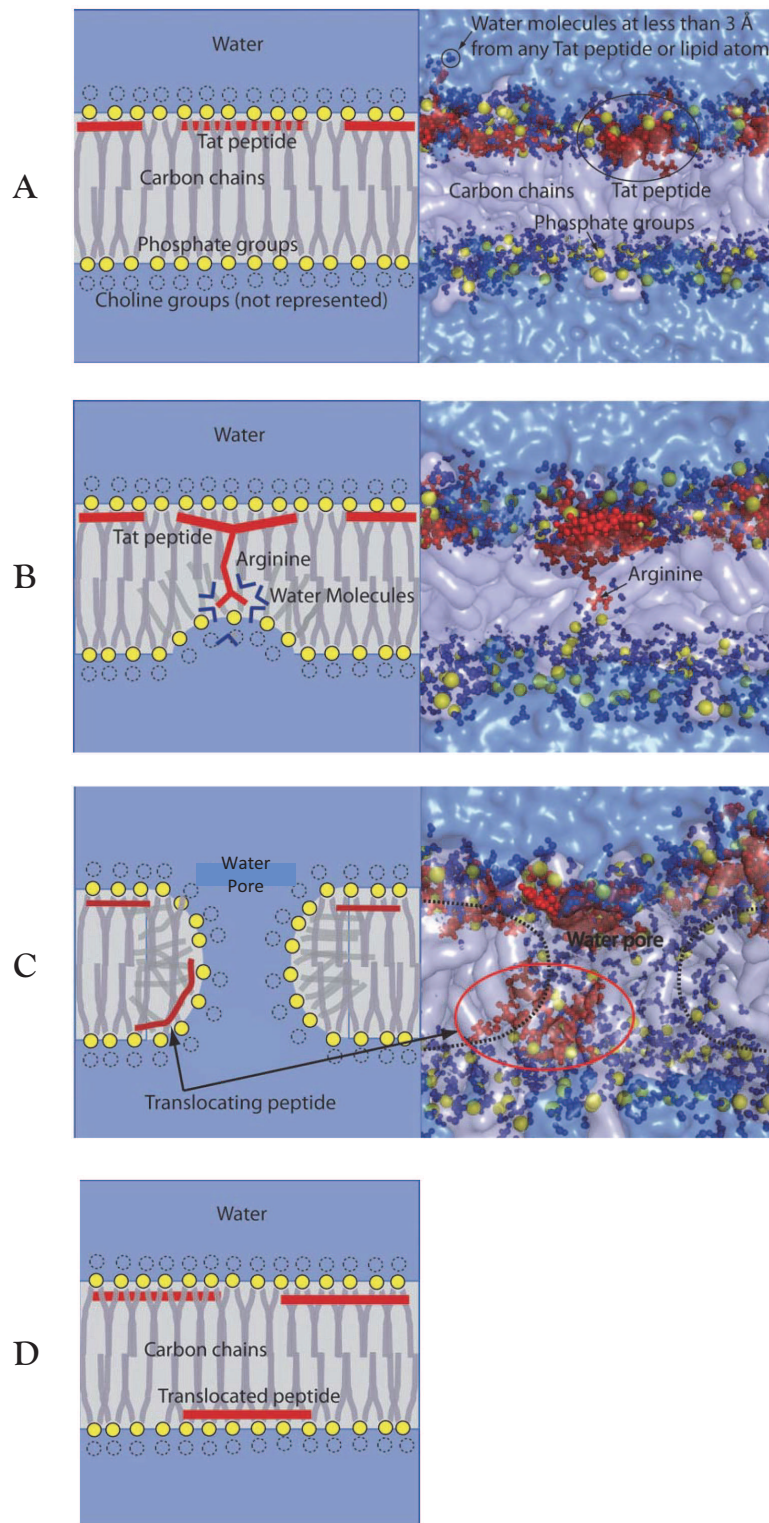


Figure 32 : Modèle de translocation du peptide TAT

A) Les peptides TAT recouvrent la membrane plasmique. B) Les résidus arginine et lysine sont attirés par les groupements phosphates de la couche lipidique interne de la membrane et s’y lient. C et D) Formation du pore et translocation des peptides puis fermeture du pore. D’après Herce et collaborateurs (Herce and Garcia, 2007).

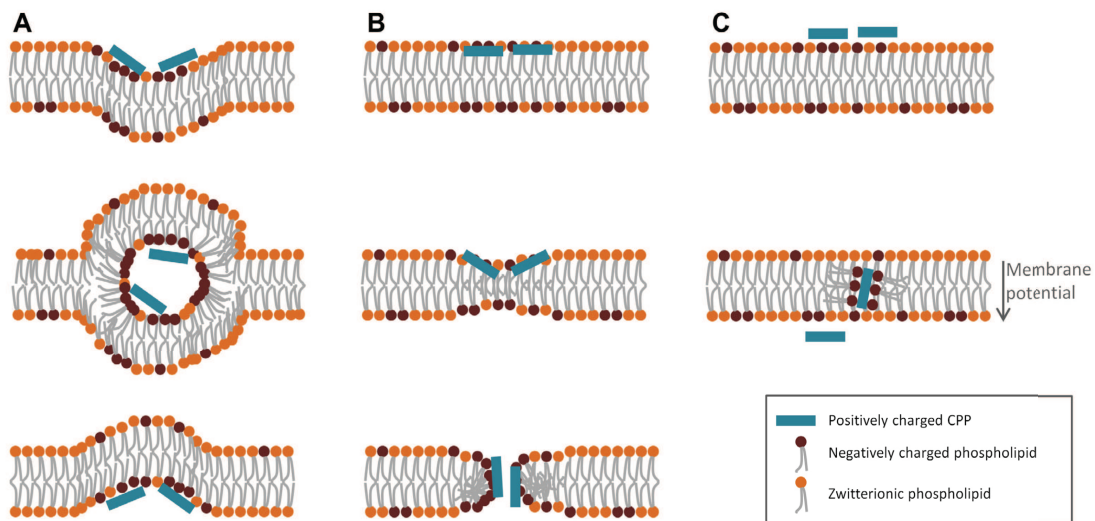


Figure 33 : Translocation directe de la membrane par les CPP

A) Le mécanisme de micelle inversée. B) Mécanisme de formation de pores dans la membrane. C) Mécanisme de diffusion du peptide à travers la membrane. D'après Bechara et collaborateurs (Bechara and Sagan, 2013).

C. Expériences *in vivo* et *in vitro*

Plusieurs études ont été menées sur les CPP *in vitro*, confirmant la capacité de ces peptides à transporter un cargo dans les cellules et induire une réponse cellulaire. Cependant, l'utilisation de CPP entraîne une certaine cytotoxicité. Afin de pallier à ce problème, il est important de définir les plus petits peptides pénétrants et cargos nécessaire à l'induction d'une réponse biologique (Cardozo et al., 2007).

Dans ce contexte, le peptide TAT présente plusieurs avantages dont une petite taille et une liaison covalente avec le cargo. Des études ont montré que le CPP-TAT lié un cargo est capable d'entrer dans des cellules primaires myéloïdes et de lignées épithéliales, et d'induire une réponse biologique. En effet, l'équipe de Hall a mis en évidence la capacité du CPP-TAT lié à une protéine mutante dominant-négatif RAS, à diminuer l'activation de la voie RAS/ERK en réponse à l'IL-5 induisant ainsi une diminution de l'activité des cellules éosinophiles primaires humaines (Hall et al., 2001). Quant à l'équipe de Ma, leur CPP-TAT fusionné à la région C-terminale de la protéine « $G\alpha$ -interacting vesicle associated protein » (GIV) est capable d'entrer dans les cellules de la lignée épithéliale HeLa et d'induire l'activation de voies de signalisation conduisant ainsi à la migration des cellules. De ce fait, ils ont testé leur CPP-TAT-cargo *in vivo* chez la souris. Ils ont réussi à induire la migration cellulaire et la production de collagène nécessaire à la guérison des blessures des animaux grâce à leur CPP-TAT-GIV. Ces données montrent que le CPP-TAT lié à son cargo peut être une molécule effectrice et ainsi initier la réponse biologique attendue (Ma et al., 2015).

Malgré un rendement élevé avec ces approches, l'utilisation des CPP *in vivo* semble encore compliquée par rapport à la non-spécificité cellulaire de ces peptides. En effet, les CPP n'étant généralement pas spécifique à un type cellulaire, leur administration par intraveineuse ou intrapéritonéale, induit leur diffusion dans tout l'organisme. Ainsi, la création de nouvelles stratégies afin de cibler des cellules spécifiques reste un point essentiel. Afin d'améliorer cette caractéristique, certaines stratégies ont commencé à se développer telle que la liaison des CPP à un ligand spécifique d'un type cellulaire ou à un polyanion avec une séquence de clivage qui permet l'activation du CPP qu'après clivage par des metalloprotéases, par exemples, présentes en grande quantités au niveau des tumeurs (Vives et al., 2008) (Regberg et al., 2012). Certaines équipes ont réussi à augmenter la spécificité des CPP pour un type cellulaire en les fusionnant avec des protéines de « domiciliation ». Ces données mettent en évidence les bénéfices qu'apporterait l'utilisation de CPP spécifiques pour le traitement de pathologies. Toutefois, à ce jour, plusieurs essais cliniques ont été menés mais aucun n'a été accepté par la FDA (Rizzuti et al., 2015).

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'homéostasie du système hématopoïétique nécessite une régulation très précise pour assurer la production contrôlée des différents lignages hématopoïétiques qui en sont issus. Ce contrôle se traduit au niveau moléculaire par la régulation de complexes de signalisation, notamment à travers les protéines adaptatrices. Ces molécules jouent ainsi un rôle primordial en régulant la réponse quantitative et qualitative des voies de signalisation en affectant la stabilité ou la fonction de leur cible, ou encore leur adressage subcellulaire.

Mon projet de thèse s'est focalisé sur l'une de ces protéines adaptatrices qu'est la protéine LNK, un régulateur négatif clé du développement des cellules lymphoïdes et myéloïdes. En effet, la fonction biologique de cet adaptateur a été déterminée grâce à l'inactivation de son gène chez la souris. De plus, l'analyse de ce modèle animal a confirmé le rôle important de l'adaptateur LNK dans des pathologies humaines :

- les souris déficientes en LNK montrent un phénotype ressemblant aux caractéristiques cliniques des patients atteints de ces hémopathies myéloïdes ;
- des mutations dans les différents domaines de l'adaptateur ont été identifiées dans des cellules de patients atteints de Néoplasmes Myéloprolifératifs (NMP) et dans les pathologies lymphoprolifératives, telles que les Leucémies Lymphoblastiques Aiguës de précurseurs de cellules B. Certaines de ces mutations entraînent une dérégulation des voies de signalisation et de la prolifération cellulaire dépendantes des voies JAK2/STAT ;
- LNK interagit avec et inhibe JAK2 sauvage (WT) mais aussi avec la forme mutée JAK2-V617F, qui est retrouvée à haute fréquence dans les NMP et entraînant l'activation constitutive de la kinase
- Un polymorphisme situé sur l'exon 2 du gène *Lnk* a été fortement associé aux NMP, ainsi qu'à des maladies inflammatoires et vasculaires.

L'ensemble de ces données ont confirmé l'implication de l'adaptateur LNK dans le développement de ces pathologies et suggèrent un mécanisme impliquant des modifications de sa localisation subcellulaire au sein des complexes de signalisation. Ceci renforce notre hypothèse de travail qui argumente sur le fait que l'adaptateur LNK régule négativement la prolifération des lignages myéloïdes, comme le lignage mégacaryocytaire, via l'interaction avec ses partenaires spécifiques, dont la kinase JAK2. Ainsi, l'analyse des complexes de signalisation spécifiques de LNK est centrale pour déterminer le rôle de l'adaptateur dans ces pathologies. Dans ce contexte, nos précédents travaux ont montré que LNK régule négativement la prolifération cellulaire dépendante de JAK2-WT et JAK2-V617F. Cette inhibition se fait par interaction avec ces formes de JAK2 via son domaine SH2 et un nouveau site de liaison situé dans la région N-terminale de l'adaptateur.

Ma thèse étant la suite de ces travaux, elle a été divisée en deux axes. Le premier axe porte sur la recherche fondamentale des mécanismes d'inhibition par lequel LNK régule JAK2. Le deuxième axe se tourne sur de la recherche appliquée visant le développement d'une approche moléculaire permettant d'utiliser LNK comme un inhibiteur spécifique de JAK2-V617F, chez les patients atteints de NMP.

Mon premier axe a porté sur la caractérisation structurale et fonctionnelle de LNK dans des contextes physiologique et pathologique. De ce fait, j'ai étudié, au niveau moléculaire et biochimique, le deuxième site d'interaction entre LNK et JAK2. Ces études ont été réalisées en utilisant des cellules dérivées des souris *Lnk*^{-/-}. Ces souris représentent un modèle cellulaire puissant pour l'étude des différents domaines et formes mutées de LNK retrouvées chez les patients atteints de NMP. Nous avons aussi analysé les formes tronquées, WT et/ou mutées de LNK et de JAK2 dans des lignées cellulaires. Les données obtenues, dans cet objectif, ont mis en évidence la fonction inhibitrice de la région N-terminale incluant le domaine PH (région NPH) sur l'activation de JAK2-WT et JAK2-V617F. Elles ont ainsi permis de proposer un mécanisme d'action de LNK dans des contextes physiologique et pathologique.

Puisque la région NPH de LNK semble s'associer préférentiellement avec JAK2-V617F et qu'elle participe à sa régulation, elle pourrait être utilisée comme un inhibiteur spécifique de JAK2 muté. Le second axe a donc consisté à développer une stratégie moléculaire pour cibler cette forme mutée de JAK2, grâce à utilisation la région NPH de LNK. Pour cela, nous avons choisi une stratégie basée sur l'emploi des peptides pénétrants (CPP), capables de faciliter l'entrée de différentes molécules à l'intérieur des cellules afin d'induire une réponse biologique. J'ai principalement développé la mise au point de deux stratégies pour optimiser la production d'une protéine CPP-LNK pure et fonctionnelle en quantité suffisante, montrant les avantages et les inconvénients de chaque stratégie. Ceci permettra de déterminer la meilleure méthode pour l'utilisation d'un CPP-LNK dans des essais biologiques fonctionnels (efficacité d'entrée dans les cellules hématopoïétiques, inhibition de l'activité kinase de JAK2-V617F). A long terme, les données obtenues dans cet axe devraient permettre de développer une approche thérapeutique optimale basée sur LNK pour le traitement de patients atteints de NMP positifs pour JAK2-V617F.

RÉSULTATS

I. Article : Les mutations de LNK retrouvées dans les Néoplasmes Myéloprolifératifs mettent en évidence une nouvelle région régulatrice de l'adaptateur sur la signalisation dépendante de JAK2.

La découverte de mutations sur l'adaptateur LNK dans les néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) et les leucémies lymphoblastiques aiguës, suggère l'implication de LNK dans le développement de ces pathologies. Néanmoins, le mécanisme par lequel ces mutations contribuent à la pathogénèse de ces maladies n'est pas clairement défini. De ce fait, nos travaux ont porté sur l'analyse du complexe LNK/JAK2 dans des contextes physiologiques et pathologiques, notamment dans les NMP. Dans nos précédents travaux, nous avons identifié un nouveau site d'interaction entre la région N-terminale et le domaine PH (région appelée NPH) de LNK et les formes JAK2-WT et JAK2-V617F. Ceci nous a permis d'initier une nouvelle étude qui porte sur l'analyse de l'interaction de ce complexe et ainsi le rôle biologique de la région NPH de LNK.

Tout d'abord, nous avons montré, grâce à l'utilisation d'une forme inactive de JAK2, que cette interaction a lieu entre LNK et JAK2-WT non-phosphorylé. Ce résultat a mis en évidence que l'interaction LNK/JAK2 se produit en absence de l'activation de la kinase. Afin d'étudier le complexe LNK/JAK2, nous avons généré différentes formes tronquées de LNK dont la région N-terminale seule, la région NPH, et le domaine SH2 avec la région C-terminale (SH2C). Les trois formes tronquées de LNK ont été co-immunoprécipitées avec les formes JAK2-WT et JAK2-V617F. Nos résultats ont démontré que cette nouvelle interaction a lieu entre la région N-terminale de LNK et les formes sauvage et mutée de JAK2. Toutefois, cette interaction est renforcée et stabilisée en présence du domaine PH. De plus, LNK-NPH montre une préférence plus élevée pour la forme active JAK2-V617F, suggérant l'implication de cette région de LNK dans la régulation différentielle des formes sauvage et mutée de JAK2.

De manière intéressante, des mutations de LNK touchant cette région NPH ont été identifiées dans les NMP. Afin de comprendre la contribution des mutations de LNK dans le développement du phénotype NMP, nous avons étudié particulièrement deux formes mutées de cet adaptateur : la mutation LNK-G152R, préalablement identifiée dans nos travaux et située dans la région N-terminale de l'adaptateur et la mutation LNK-E208Q, étant l'une des mutations situées dans le domaine PH de l'adaptateur. Ces deux domaines jouent un rôle important dans la localisation de la protéine LNK au complexe de signalisation, situé à la membrane plasmique. Dans ce contexte, à partir de modèles de progéniteurs indifférenciés purifiés issus de la moelle osseuse des souris *Lnk*^{-/-} (exprimant JAK2-WT), des cellules hématopoïétiques (exprimant JAK2-V617F endogène, lignée HEL érythroblastique) et des cellules COS7, exprimant les différentes formes sauvages, tronquées ou mutées de LNK ; nos analyses ont porté sur :

- l'interaction des deux domaines avec leur partenaire JAK2 au sein du complexe de signalisation, analysée par immunoprécipitation ;
- leurs effets fonctionnels sur la croissance cellulaire des progéniteurs mégacaryoblastiques et érythroblastiques, à l'aide des essais de proliférations ;
- leurs adressages subcellulaires, grâce à des expériences de fractionnement cellulaire et d'imagerie.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que la région NPH de LNK participe au maintien de JAK2 à l'état basale. De plus, nos essais de prolifération ont montré que la mutation dans le domaine PH, LNK-E208Q, n'a aucun effet sur la prolifération des progéniteurs mégacaryoblastiques ou érythroblastiques. En revanche, la mutation dans la région N-terminale, LNK-G152R inhibe partiellement la prolifération de ces cellules. Ces protéines mutées présentent un défaut de localisation subcellulaire, notamment pour le mutant E208Q, ce qui explique en partie, la perte de la fonction inhibitrice de cette forme mutée de l'adaptateur.

L'ensemble de nos données a permis de mettre en évidence pour la première fois, le rôle régulateur de la région LNK-NPH sur l'activité biologique de la kinase JAK2, et également de proposer un modèle du mécanisme d'action de ces mutations de LNK dans des contextes physiologique et pathologique, tel que les NMP.

Ces travaux font l'objet d'une publication : « Myeloproliferative Neoplasm mutations in LNK adaptor define a novel modulatory region for JAK2-mediated signals » A. Jungalee*, H. Magdoud*, et al. (*contribution à parts égales dans ce travail).

Myeloproliferative Neoplasm Mutations in LNK Adaptor Define a Novel Modulatory Region for JAK2-Mediated Signals

Running title: *LNK* mutations affect a regulatory region for JAK2

Hajer Magdoud¹⁻⁵, Anouchka Jungalee¹⁻⁵, Elisabetta Dondi¹⁻⁴, Olivier Schischmanoff¹⁻⁴, Nadine Varin-Blank¹⁻⁴ and Laura Velazquez^{1-4*}

¹Inserm UMR U978; ²Université Sorbonne Paris Cité; ³Labex Inflammex and ⁴Université Paris 13, UFR SMBH, Bobigny, France

⁵These authors contributed equally to this work

*** Corresponding author:**

Dr. Laura Velazquez

UMR U978 Inserm, Université Paris 13,
UFR SMBH,
74, rue Marcel Cachin,
93017 Bobigny,
France
Tel: +33 01 48 38 73 90
Fax: +33 01 48 38 73 69
Email: laura.velazquez@inserm.fr

Abstract count: 241 words

Text count: 3899 words

References count: 37

Figures: 7

Scientific category: MYELOID NEOPLASIA

Submitted February 7th, 2016

H. M. and A. J. contributed equally to this study.

Key points

1. The amino-terminal and PH domains of the LNK adaptor define a novel region regulating JAK2 biological activity.
2. Myeloproliferative neoplasm mutations in this region affect LNK subcellular localization and thereby JAK2-mediated pathways.

ABSTRACT

Somatic and germline mutations in LNK adaptor protein have been identified in Myeloproliferative Neoplasms (MPN) and Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL) patients, indicating the important contribution of the adaptor to these haematological neoplasms. However, the biological consequences of *LNK* mutations on MPN pathogenesis are still unclear. To understand how *LNK* mutations may contribute to MPN phenotype, we carried-out a structure-function study of distinct *LNK* missense mutations in the amino (N)-terminal and PH domain (NPH) of Lnk, described in JAK2-V617F-negative MPN patients. Cellular expression of Lnk truncated forms indicated that the NPH region of the adaptor associates with non-phosphorylated wild-type JAK2 to maintain the kinase activity at basal level. Moreover, this region associated differently with active JAK2 mutant forms, suggesting a distinct Lnk regulatory mechanism depending on the pathogenic context. Using human erythro/megakaryocytic cells expressing *LNK* mutations in the NPH region, we showed that these mutations modified the Lnk/JAK2 active complex, likely due to abnormal Lnk subcellular localization. Finally, we found that the Lnk N-terminal region and PH domain modulate inhibition of JAK2-dependent proliferation of megakaryocyte progenitors and myeloid cell lines. This further correlated with JAK2/STAT5 and MAPK activation. Altogether, our results indicate that the NPH region of Lnk plays an important role in the dynamics of Lnk-JAK2 complex with functional consequences on JAK2 biological activity. In this way, genetic changes in *LNK* enhance JAK2 signalling and they might cooperate with other activating mutations in the JAK/STAT pathway to abnormal signalling in MPNs.

INTRODUCTION

Myeloproliferative neoplasms (MPN) are a phenotypically heterogeneous group of stem cell-derived clonal hematopoietic disorders, characterized by excessive production of mature myeloid cells.¹ ‘Philadelphia chromosome-negative (Ph⁻)’ MPNs are namely Polycythemia vera (PV), Essential thrombocythemia (ET) and Primary myelofibrosis (PMF). The genomic landscape of MPN radically changed with the discovery of a gain-of-function acquired mutation in Janus kinase 2 (JAK2) tyrosine kinase, termed JAK2-V617F. This finding was rapidly followed by the identification of other mutations relevant to disease pathogenesis with varying frequency, targeting genes involved in signalling, epigenetic dysregulation and leukemic transformation.² These data confirmed that MPN are complex diseases, resulting from the combination of several genetic events, notably affecting the activation and regulation of the JAK/STAT pathway.³

One important regulator of JAK2 signalling is the LNK (or SH2B3) adaptor protein, a member of the family of adaptors also composed of SH2-B (SH2B1) and APS (SH2B2). These proteins share a dimerization domain and proline-rich motifs at the amino (N)-terminus, a pleckstrin homology (PH) and Src-homology-2 (SH2) domains and several potential phospho-acceptor tyrosine and serine residues.⁴⁻⁶ Lnk is highly expressed in hematopoietic stem cells and myeloid progenitors, notably in the megakaryocytic lineage.⁵⁻¹⁰ Mice deficient for *Lnk* display abnormal megakaryopoiesis and erythropoiesis, due to the absence of negative regulation of thrombopoietin (TPO) receptor, MPL, and erythropoietin (EPO) receptor (EPOR) signalling pathways, respectively.¹¹⁻¹³ Indeed, Lnk negatively modulates these cascades by attenuating JAK2-WT and mutant V617F activation, mainly in a dose-dependent manner *via* its SH2 domain, but also likely by binding JAK2 through another region.^{7,14,15}

Several evidences have highlighted the important role of LNK in MPNs: 1) ablation of *Lnk*

promotes the development of an MPN-like phenotype in mouse models^{5,16} 2) a nonsynonymous single nucleotide polymorphism (nsSNP, 784T>C, R262W) in exon 2 of the *LNK* gene, associates significantly with JAK2-V617F-positive MPN,¹⁷ and 3) mutations affecting different regions/domains of the adaptor have been identified in MPNs^{14,18-23} and ALL.²⁴ Some of these mutations evoke dysregulated JAK/STAT signalling and dependent proliferation,^{19,25} suggesting a contribution of the adaptor to MPN pathogenesis. However, the precise biological consequences of *LNK* mutations on MPN phenotype remain unclear.

In this work, we investigated the molecular mechanism of two distinct *LNK* N-terminal and PH domain (NPH) missense mutations in order to define their biological effect on MPN phenotype. Our results revealed that the NPH region of Lnk binds to non-phosphorylated JAK2-WT and modulates its kinase activity at the basal level. Alteration of this region through deletion, MPN mutations or by binding to JAK2 mutant forms results in upregulation of JAK2 kinase activity and changes mainly in Lnk phosphorylation status and subcellular localization. Functionally, cell proliferation assays showed that Lnk NPH region is important for the regulation of JAK2-dependent proliferation of myeloid progenitor and mature cells. Therefore, our results reveal the Lnk-NPH region as a novel regulatory domain for JAK2 biological functions. Inactivation of this region cooperates with JAK2 and/or other activating mutations in the JAK/STAT pathway to enhance abnormal signalling and thus contributing to MPN phenotypic switch.

MATERIALS AND METHODS

Mice and cell culture

Wild-type (WT) and *Lnk*-deficient mice⁵ were housed under pathogen-free conditions. This study was approved by the Université Paris 13 SMBH Animal facility review board. HEL (erythroleukemia) and UT7/Mpl (megakaryoblastic) cell lines were grown, starved and stimulated, as previously described.¹⁴ COS7 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 1% Penicillin/Streptomycin (Life technologies) at 37°C in 5% CO₂.

Plasmid constructs

Lnk-N-Term (residues 1-178), NPH (residues 1-290) and SH2C (residues 240-548) constructs were generated by polymerase chain reaction (PCR), sequenced and subcloned in the pFLAG-CMV expression vector (Figure 1A). JAK2 mutations were generated in mouse pEFBos-JAK2-HA (gift from Dr. D. Barber, Toronto, Canada). The *Lnk*-R364M was described previously.²⁶ The equivalent human *LNK* mutations Glycine (G)152 to Arginine (R, G152R) and Glutamic acid (E)208 to Glutamine (Q, E208Q) were generated in murine *Lnk* cDNA, G131R (GR) and E182Q (EQ), respectively, in pFLAG-CMV and pMPI.²⁷ All mutations were introduced using QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Agilent Technologies) and confirmed by DNA sequencing.

Immunoprecipitation and immunoblotting

Cell lysates were prepared as previously described¹⁴ and analysed either directly by immunoblotting or by immunoprecipitation with specific antibodies for 2 hours at 4°C. Antibodies

complexes were detected with either horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Biorad), revealed by enhanced chemiluminescence (ECL; GE Healthcare), visualized and quantified with the ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

Immunofluorescence and cell fractionation

HEL cells were grown on fibronectin-coated glass coverslips (Superfibronectin, 50 ng/mL, Sigma-Aldrich), incubated or not with 15 nM of o-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA, Sigma-Aldrich) for 24 hours, fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized in 0.25% Triton X-100. Lnk proteins were detected using rabbit anti-NLk antibodies followed by Alexa 647-conjugated anti-rabbit antibodies (Molecular Probes). Images were acquired with a spinning disk microscope (Leica DMI6000) with a 63x objective and analysed by Image J software (NIH, Bethesda MD). For cell fractionation experiments, TPA-treated or not HEL cells were fractionated using the Subcellular Protein Fractionation kit (Mem-PER Plus, Thermo Fisher Scientific) following the manufacturer's protocol.

Retroviral transduction, Lin⁻ progenitor purification and in vitro colony assays

Hematopoietic cell lines were retrovirally infected with supernatants commercially produced (10^6 cfu/mL, Lentivectors production facility, SFR BioSciences Gerland-Lyon, France). Lin⁻ progenitor cells from bone marrow were purified using a lineage-cell depletion kit according to the manufacturers' instructions (Miltenyi Biotec) from 5-fluorouracil (5-FU)-treated (150 mg/kg intraperitoneally, 4 days before) WT and *Lnk*^{-/-} mice. Cells were stimulated for 24 hours,²⁶ retrovirally infected with Plat-E supernatants (Supplemental data) and green fluorescence protein (GFP) positive-sorted after 48 hours of infection. 1.5×10^4 cells were seeded in duplicate in collagen-based media (MegaCult-C, StemCell Technologies) and incubated at 37°C, 5% CO₂.

CFU-Megs were stained for acetylcholinesterase activity (Sigma-Aldrich) and counted after 6 days of incubation.

Structure-based sequence alignment

A secondary structure model for Lnk was built using the alignment obtained with the Partial Order Structure Alignment (POSA) software.²⁸

RESULTS

The N-terminal region of Lnk by its own binds JAK2 forms

Former results showed that Lnk bound stronger to JAK2-V617F than JAK2-WT form.^{7,14,15} This difference could be attributed to Lnk binding to JAK2 via tyrosine residues in JAK2-V617F, others than the described Y613 and Y813.⁷ We therefore co-expressed Flag-tagged Lnk-WT with JAK2-V617F mutated in these tyrosine residues in COS7 cells (Figure 1A). All Lnk and JAK2-V617F mutant forms displayed similar levels of expression. As expected, phosphorylated JAK2-V617F strongly co-immunoprecipitated with Lnk-WT, resulting in high Lnk phosphorylation (Figure 1B). A similar result was obtained on Lnk-JAK2 association with JAK2-V617FY613F (VFY613F) mutant, however a reduction in the phosphorylation of associated Lnk was observed. In contrast, the amount of phosphorylated JAK2 associated with Lnk was substantially diminished with mutants Y813F and Y613F/Y813F (VF2F), resulting in the abolition of Lnk phosphorylation (Figure 1B). These results show that JAK2-V617F does not utilize other tyrosine residues to mediate this Lnk-SH2 association, neither has it changed the SH2 domain preference for Y613/813. Conversely, expression of Lnk-SH2 inactive form (RM) resulted in abolition of Lnk phosphorylation, while still displaying Lnk-JAK2 interaction (Figure 1B), which indicates the presence of an Lnk SH2-independent binding site for JAK2.

To prove that this latter binding site does not involve phosphorylated tyrosines in JAK2, we co-expressed Flag-tagged Lnk-WT with JAK2-WT or kinase-inactive K882E (KE) forms in COS7 cells (Figure 1A). Flag-Lnk was immunoprecipitated and the presence of active and total JAK2 in the complex was detected by immunoblotting with specific antibodies. Both JAK2 forms associated with Lnk-WT, however, the phosphorylated forms of the kinase and of the adaptor were only detected in JAK2-WT-expressing cells (Figure 1C). The expression level of Lnk and JAK2

proteins was similar. As for JAK2 forms, only JAK2-WT was tyrosyl phosphorylated, as assessed by immunoblotting. These data confirm that Lnk binds to non-tyrosyl-phosphorylated JAK2, most likely *via* its N-terminal region. To confirm this, two Lnk mutant proteins containing either the N-terminal region without (N-term) or with the PH domain (NPH) were generated and flag-tagged at the N-terminus (Figure 1A). The Lnk mutants were individually co-expressed with kinase-inactive JAK2-K882E in COS7 cells and then immunoprecipitated with anti-flag agarose beads. The immune complexes were detected with anti-JAK2 and anti-flag antibodies. Both Lnk forms were able to bind JAK2-K882E (Figure 1D, top panel). These results indicate that the N-terminal region and PH domain of Lnk mediate Lnk binding to inactive, non-tyrosyl phosphorylated JAK2.

To determine if this Lnk region was sufficient for its interaction with JAK2, Flag-tagged Lnk forms truncated at either their C- or N-terminus (Figure 1A), were co-expressed with JAK2-WT in COS7 cells, immunoprecipitated with anti-Flag antibodies and then analysed by western blotting. JAK2-WT coimmunoprecipitated with WT or N-terminal-deleted (SH2C) Lnk proteins, which resulted in Lnk phosphorylation (Figure 1D, lanes 1 and 4). In contrast, the N-terminal (N-term) region of Lnk bound only weakly to JAK2, whereas the presence of the PH domain (NPH protein) enhanced this association (Figure 1D, lane 2 and 3).

We next examined the impact of different JAK2 mutations on their binding to Lnk-NPH region. We analysed three distinct JAK2 pathogenic forms: two predominant in MPNs, V61F (VF, exon 14) and K539L, (KL, exon 12)²⁹ and one in ALL, R683G (RG, exon 16).³⁰⁻³¹ COS7 cells co-expressing Lnk truncated proteins with JAK2 mutants were immunoprecipitated with anti-Flag antibodies and then analysed by immunoblotting. Association of JAK2-V617F and JAK2-KL with Lnk forms was comparable to JAK2-WT, apart from now causing the substantial phosphorylation of Lnk-WT and SH2C proteins (Figure 1D, lanes 5-8, 9-12). JAK2-RG mutant kinase also associated with all Lnk forms, however, the adaptor was this time only weakly phosphorylated

(Figure 1D, lanes 13-16). Similar amounts of JAK2 and Lnk forms were expressed and immunoprecipitated [for Lnk] (Figure 1D and supplementary S1). Together, these results indicate that the Lnk N-terminal region binds by its own all JAK2 forms and the presence of the PH domain reinforces this binding. Moreover, phosphorylation of the Lnk-SH2C form demonstrates the presence in this truncated protein of tyrosine residues that are specific targets for JAK2 phosphorylation.

***Lnk* mutations do not affect Lnk-JAK2 association, but their phosphorylation status**

We and others have initially reported mutations in LNK affecting the N-terminal region (*LNK*-G152R, GR) and PH domain (*LNK*-E208Q, EQ) in chronic-phase *JAK2*-WT MPN patients.^{14,19} To investigate their role on cytokine-induced JAK2 phosphorylation, we introduced these mutations into a Flag-Lnk construct (Lnk-GR and -EQ) and co-expressed them first with JAK2-WT and EPOR in COS7 cells (Figure 2A). JAK2 activation with or without EPO-stimulation was detected in total cell lysates with anti-phospho-specific antibodies. Control vector and Lnk-WT cells exhibited low basal JAK2 phosphorylation, which increased upon EPO-stimulation. In contrast, cells expressing Lnk-GR and Lnk-EQ displayed elevated JAK2 basal activation with no further increment upon cytokine-stimulation, (Figure 2A). To examine whether NPH mutations could affect Lnk association with JAK2-WT, cell lysates previously EPO-stimulated or not, were immunoprecipitated with anti-Flag antibodies and analysed by immunoblotting with specific antibodies. All Lnk forms similarly precipitated JAK2-WT and this resulted in phosphorylation of Lnk forms, notably of Lnk-GR mutant protein (Figure 2B). Altogether, these data indicate that mutations in the N-terminal and PH domains affect JAK2 basal activity, thus suggesting an important role of the NPH region in JAK2 regulation at this level.

We next investigated the effect of *LNK* mutations in a *JAK2-V617F* context. Flag-Lnk constructs were co-expressed with *JAK2-V617F* and EPOR in COS7, stimulated or not with EPO and immunoprecipitated with anti-Flag antibodies. Additionally, HEL cells (endogenous *JAK2-V617F*) also expressing Lnk mutant forms were precipitated with anti-Lnk antibodies. In both cellular systems, WT-, GR- and EQ-Lnk mutant proteins associated with phosphorylated *JAK2-V617F* kinase, resulting in Lnk phosphorylation (Figure 2C-D). Both *JAK2* association and Lnk phosphorylation were again strikingly evident in Lnk-GR-expressing cells, demonstrating a preferential interaction between phosphorylated Lnk and *JAK2* forms in the presence of this mutation, already at basal level. Therefore, these results demonstrate that these *LNK* mutations do not affect Lnk/*JAK2* association, but their phosphorylation status in the complex.

Lnk-NPH mutant forms exhibit defects in their subcellular localization

The dimerization and PH domains, together with specific sequences in the N-terminal region facilitate the subcellular recruitment of the Lnk/SH2B adaptor proteins to their binding partners, a crucial function for their physiological effects.^{6,32,33} Since our study implicate Lnk mutations in the NPH region, we examined whether they could modify either Lnk's capacity to homodimerize or its subcellular localization, that may explain their effect on Lnk phosphorylation and *JAK2* association. We first analysed the effect of Lnk NPH mutations on its homodimerization. For this, we co-expressed in COS7 cells Myc-tagged WT N-terminal or NPH Lnk forms with either WT, GR or EQ mutant proteins expressing a Flag-tag. We next performed anti-Flag immunoprecipitations and immunoblotted with anti-myc antibodies. Our results showed that the dimerization domain was sufficient to mediate Lnk homodimerization. Mutations in the N-terminal region (*Lnk-GR*) or the PH domain (*Lnk-EQ*) did not affect this function, but rather

seemed to slightly increase Lnk dimer formation, thus suggesting a role for dimerization in Lnk's inhibitory function (Figure 3A).

We next investigated the effect of these same NPH mutations on Lnk subcellular localization. For this, HEL cells expressing WT and mutant Lnk forms were stimulated for 24h with a low dose of TPA. This treatment induced expression of megakaryocyte-specific markers and a megakaryocyte-like morphology (Supplementary Figure S2A and³⁴). Cytosolic and membrane fractions from TPA-induced cells were then analysed. As shown in figure 3B, Lnk-WT and -RM proteins were detected mainly in the cytosolic fraction with a smaller portion at the plasma membrane. However, Lnk-GR localized in both the cytosolic and remarkably, at the plasma membrane fractions. In contrast, Lnk-EQ was mostly found in the cytosolic fraction, albeit at slightly lower expression level than the other forms. Similar results were obtained without TPA (Supplementary Figure S2B).

These results were further confirmed by confocal microscopy. TPA-treated HEL cells expressing Lnk forms were stained with anti-Lnk antibodies, imaged and fluorescence intensities quantified in cytoplasm and membrane regions. Lnk-WT and SH2-inactive RM-expressing cells, exhibited a similar steady-state percentage of cytoplasmic (Cyt), notably in the perinuclear region,³⁵ and plasma membrane (PM) distribution. In contrast, the PH mutant Lnk-EQ was less expressed and mainly localized in the cytoplasm, rather than at the plasma membrane. Subsequently, analysis of the N-terminal Lnk-GR mutant showed a slightly higher percentage of localization at the plasma membrane in comparison to the other Lnk forms (Figure 3C). Together, these results show that the N-terminal and PH domains are important for Lnk dimerization and its specific recruitment to the plasma membrane to exert its inhibitory function at the signalling complex.

Mutations in LNK-PH domain may affect phosphoinositide-binding pocket

Most of the *LNK* mutations identified to date cluster in the PH domain, suggesting that these mutations affect plasma membrane-targeting of the adaptor. However, it is still unclear how *LNK*-PH mutations may disrupt this biological function. To elucidate the potential role of the PH mutations in the pathological mechanism, we built a secondary structure model for LNK-PH domain based on the alignment with structures of crystalized PH domains from selected signalling molecules and the high sequence homology of LNK with APS. This PH alignment allowed positioning of all Lnk-PH mutations reported so far, in or proximal to the β 1- β 2 loop, β 2 strand and β 2- β 3 loop. Importantly, most of these sequences are involved in the specification of the phosphoinositide (PI)-binding pocket (Figure 4 and Supplementary Figure S3A). In particular, residue E208 maps to the loop connecting strands β 1- β 2 and it is one of the residues implicated in PI-binding (Figure 4 and Supplemental Figure S3A-B). This result thus indicates that mutation E208Q, likely causes a change of affinity for PI.

Lnk N-terminal and PH domains modulate differently JAK2-dependent proliferation

We have previously shown that both SH2 and PH domains contribute to Lnk-mediated growth inhibition of megakaryocytic progenitors (CFU-Meg).¹⁴ To assess the outcome of Lnk NPH region mutations on CFU-Meg proliferation, we retrovirally expressed them in Lin⁻ progenitor cells derived from *Lnk*-deficient animals. GFP⁺ Lin⁻ cells expressing these Lnk mutant forms were sorted, their expression confirmed by RT-PCR (Figure 5A) and assayed *in vitro* for CFU-Meg growth to evaluate their clonogenic potential. Expression of Lnk-WT in *Lnk*^{-/-} progenitors reduced CFU-Meg colony numbers compared with Lin⁻*Lnk*^{+/+} cells. In contrast, Lnk-EQ mutant displayed

comparable colony-forming numbers to vector-transduced *Lnk*^{-/-} cells, while the Lnk-GR expressing cells partially inhibited the colony formation (Figure 5B). Consistent with the colony numbers, a difference in the colony size was observed for the different Lin⁻-transduced clones (Figure 5C).

Because of the heterozygous state prevalence of the *LNK* mutations in MPN patients, we were then interested in analysing the proliferative consequences of *Lnk*-EQ and *Lnk*-GR mutants' expression in a heterozygous *Lnk* (*Lnk*^{+/-}) genetic context. Lnk mutant forms were expressed this time in Lin⁻ progenitor cells derived from *Lnk*^{+/-} mice, sorted as previously described and assayed for CFU-Meg growth. As expected, Lnk-WT expression in *Lnk*^{+/-} progenitors reestablished normal numbers of CFU-Meg colonies similarly to Lin⁻ cells derived from wild-type animals. Likewise, expression of Lnk-GR mutant also reduced CFU-Meg colony formation. In contrast, Lnk-EQ mutant exhibited again colony-forming numbers comparable to *Lnk*^{-/-} cells expressing vector control (Figure 5D). Therefore, these results confirm that the Lnk-NPH region is important for its inhibitory function during expansion of megakaryocytic progenitors. In this context, the Lnk-E208Q mutant can act as a dominant negative protein to inhibit the Lnk wild-type form.

We next examined the effect of Lnk mutations on cell proliferation in a JAK2-V617F context (HEL cells). Expression of WT-Lnk led to significant cell growth inhibition (Figure 6A). In contrast, Lnk-EQ and -GR mutant forms considerably reduced this inhibitory function, similar to control vector or SH2-inactive RM-expressing cells. Besides, this effect on cell proliferation correlated with maintenance of JAK/STAT and MAPK activation in HEL cells expressing Lnk mutant forms, alike vector-expressing cells (Figure 6B). Altogether, these results demonstrate that the N-terminal and PH domains of Lnk modulate JAK2-mediated signalling pathways involved in cell proliferation of myeloid progenitors and mature cells in both physiological and pathological contexts.

DISCUSSION

LNK mutations in human MPN target different domains of the LNK protein, notably its PH domain. Although these mutations have been identified in multiple MPN subtypes, at both chronic and blast-phase, their biological consequences on MPN pathogenesis remain unclear. We therefore performed a structure-function analysis of mutations in the N-terminal region and PH domain (NPH) of the adaptor, by characterizing *Lnk*^{-/-}-derived progenitors and hematopoietic cell lines expressing WT and MPN mutated forms of either *Lnk* or JAK2. Our results revealed that the NPH region of *Lnk* serves as an inhibitory domain for JAK2 activity at the basal level. Alteration of this region through deletion or MPN mutations led to upregulation of JAK2 kinase activity and of its subsequent biological responses, in particular in the megakaryocytic lineage. Furthermore, we demonstrated that these *LNK* mutations modified the *Lnk*/JAK2 active complex through changes in *Lnk* phosphorylation and subcellular localization that together with JAK2 pathogenic forms, can alternatively lead to MPN phenotypic switch.

We previously suggested that besides the SH2 domain, another JAK2 binding site within the *Lnk*-NPH region could associate with the inactive kinase.¹⁴ Here, we confirm that this second site binds to inactive, non-phosphorylated JAK2 and is mediated by the N-terminal region of the adaptor with the PH domain stabilizing further the interaction. A similar JAK2 bipartite interaction site has been reported for SH2B and APS, members of the *Lnk* family and activators of JAK2. In these proteins, the second JAK2-binding site includes the PH domain and the PH-SH2 linker region and it ensures inhibition of the kinase in the unstimulated state and a robust response upon ligand stimulation.^{36,37}

For *Lnk*, our data show that its NPH region also functions as an inhibitory domain to prevent abnormal JAK2 activation at the basal level. Contrary to SH2B and APS, this region may help

binding of the SH2 domain to ligand-activated JAK2 to exert Lnk full inhibitory function on the kinase. This is favoured by Lnk localization to the plasma membrane, notably via its PH domain and its dimerization via its N-terminal domain. Indeed, our analysis of Lnk mutations in MPNs confirms that disruption of the NPH region does not affect Lnk/JAK2 interaction (this work and²⁵), but rather the ratio of phosphorylated Lnk/JAK2 within the active complex. This may be partly caused by altered subcellular addressing of Lnk mutant forms. Furthermore, these molecular effects on Lnk were more pronounced in the presence of MPN JAK2 kinases V617F and K539L, which hint at a tighter interaction between these JAK2 pathogenic proteins and Lnk. Surprisingly, association between Lnk and B-ALL JAK2-R683G had a weaker effect on the phosphorylation of the adaptor that suggests a different mechanism of JAK2 regulation depending on the pathological context.

Concerning the PH domain, our proliferation studies on *Lnk*^{-/-} megakaryocytic progenitors and HEL cells expressing the E208Q PH-mutation, confirmed the importance of this domain in mediating Lnk-inhibitory function in myeloid lineages. This also correlated with regulation of the JAK2/STAT5 and MAPK pathways, in accordance with a previous report on human CD34⁺ progenitor cells harbouring *Lnk*-PH mutations.¹⁹ Importantly, the E208Q mutation is the only PH mutation to date identified in a JAK2-WT ET patient and together with our results on megakaryocyte progenitor cell growth, these data highlight the potential role of this mutation in ET phenotype.

Furthermore, TPA-treated HEL cells allowed us to examine the biochemical and cellular consequences of *LNK* mutations on its localization in megakaryocyte-like cells and in a JAK2-V617F context. Our results thus confirm that Lnk-PH domain is necessary for the adaptor to translocate properly to the plasma membrane (Figure 3). Moreover, our PH domain structural

analysis has positioned all LNK-PH mutations in or around residues important for phospholipid interaction. Accordingly, mutations in these sites are expected to destabilize the PH-PI-interaction with mild-to-severe consequences on Lnk membrane-localization. Besides, these mutations may cooperate with other genetic changes in the JAK/STAT pathway to contribute to different MPN phenotypes and/or leukemic transformation. In this context, our results on the association of the SNP *LNK* R262W to JAK2-V617F-positive MPNs¹⁴, support this possibility and further suggest that this polymorphism could also associate with other *LNK* mutations to predispose to certain MPN phenotypes.

Regarding Lnk N-terminal mutant protein, our data showed that it preferentially associates with active JAK2 (WT and V617F), probably favoured by its increased localization at the plasma membrane and resulting in upregulation of JAK2 biological responses. Therefore, these results reveal a novel function for this Lnk region on the modulation of its partners/effectors, as shown for JAK2 activity. In this context, the G152 residue lies next to one of the two serine (S) residues (human S150, murine S129) reported as binding sites for 14-3-3 proteins.⁶ Moreover, S150 corresponds to residues S161/165 in SH2B1 β that when phosphorylated, regulate the cellular localization and function of SH2B1 β adaptor, through electrostatic interactions.³³ In the case of G152R, this positively-charged mutation may hinder S150 phosphorylation, resulting in partial retention of the Lnk mutant protein at the plasma membrane and in the defective functional interaction with its partners JAK2 and 14-3-3, respectively. Further analysis of LNK phosphorylation status in MPNs should shed light into the precise role played by these post-translational modifications of the adaptor on its partners/effectors association and inhibition in pathological contexts.

Recently, another missense mutation (464C>T, P155L) in LNK N-terminal region was identified

in one patient with JAK2-WT erythrocytosis.¹⁸ The P155L variation resides next to residue G152, outside the dimerization domain, which suggests a potential mutational preference for this spot in the N-terminal region in MPNs. Both mutations are predicted to affect protein function using the SIFT software (sift.jcvi.org) and probably damaging with PolyPhen-2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/). Interestingly, N-terminal mutations have been found so far in patients with ET and erythrocytosis, which underlies the important role of LNK in the erythroid/megakaryocytic lineage, akin to E208Q PH mutant. Lastly, a structural model to understand the mechanism of action of LNK-N-terminal mutations could not be generated since the crystal structure of this LNK region has not yet been determined.

Altogether, our results allow proposing a model in which Lnk through its NPH region binds to inactive JAK2 to prevent abnormal kinase activation at basal state. Upon growth factor stimulation, conformational changes may facilitate dissociation of Lnk N-terminal region from JAK2, favouring kinase activation and function. Signal termination will occur through the association of the adaptor with active JAK2 *via* Lnk-SH2 domain and probably with its dimerization domain reinforcing this interaction. This interaction will lead to Lnk phosphorylation and down-regulation of JAK2 kinase activity and pathways. In this model, *Lnk* mutations may act either by stabilizing JAK2 in an active conformation (G152R mutation) or affecting Lnk localization (E208Q) at the plasma membrane near the signalling complex (Figure 7).

In summary, this study contributes to the pathophysiological understanding of *LNK* missense mutations in MPN. Both N-terminal region and PH domain mutations impair not only LNK cellular localisation, but also may favour homodimerization between WT and mutant Lnk forms, considering the heterozygous state prevalence of most *LNK* mutations identified to date. Additionally, our structural analysis of Lnk-PH mutations has underscored their functional

consequences by disruption of key residues involved in phospholipid interaction. Importantly, our findings have revealed a novel function for Lnk-NPH as an important negative regulatory region for JAK2. Future studies focusing on LNK-base strategies to target specifically JAK2 pathogenic forms are warranted to have significant therapeutic implications in chronic myeloid and lymphoid diseases involving this kinase.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Nicole Boggeto and Griselda Wentzinger (ImagoSeine facility, Institute Jacques Monod) for assistance with flow cytometry sorting, Pierre Bourdoncle (Cochin Imaging facility, Institute Cochin) for help with confocal microscopy and imaging analysis, Gisèle Froment, Didier Nègre and Caroline Costa (Lentivectors production facility/SFR BioSciences Gerland - Lyon Sud, UMS3444/US8) for retroviral supernatants production and Drs. L. Gardano and C. Leroy for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Institut National de la Santé et la Recherche Médicale (Inserm), the Université Paris 13, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-Idex 005-02EL) Labex Inflammex, the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) and the Association Laurette Fugain. H. M. was the recipient of PhD scholarships from the Groupe d'Etude sur l'Hémostase et la Thrombose (GEHT), ARC and Labex Inflammex. A. J. is the recipient of a PhD scholarship from the Ministère de l'Éducation, de la Recherche et la Santé (MERS).

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Contribution: H.M. and A.J. performed experiments, made the figures and contributed equally to the manuscript; E.D. designed research, analysed and interpreted data, made figures and contributed to the manuscript; O.S. performed the structural analysis; N.V.B. contributed scientific discussion and reviewed the manuscript and L.V. designed and performed research, analysed the data and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Laura Velazquez, UMR U978 Inserm, Université Paris 13, UFR SMBH, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France; email: laura.velazquez@inserm.fr

REFERENCES

1. Vakil E, Tefferi A. BCR-ABL1-Negative Myeloproliferative Neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis and treatment. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2011; 11(S1):S37-45.
2. Milosevic JD, Kralovics, R. Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol*. 2013; 97: 183-197.
3. Pasquier F, Cabagnols X, Secardin L, Plo I and Vainchenker W. Myeloproliferative Neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2014; 14 (S3):S23-35.
4. Velazquez, L. The Lnk adaptor protein: a key regulator of normal and pathological hematopoiesis. *Arch Immunol Ther Exp*. 2012; 60(6):415-29.
5. Velazquez L, Cheng MA, Fleming EH, et al. Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in *Lnk*-deficient mice. *J Exp Med*. 2002; 195 (12):1599-1611.
6. Jiang J BJ, Rozenova K, Cheng Y, Bersenev A, Wu C, Song Y, Tong W. 14-3-3 regulates the LNK/JAK2 pathway in mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *J Clin Invest*. 2012; 122 (6):2079-2091.
7. Bersenev A, Wu C, Balcerek J, Tong W. Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest*. 2008; 118: 2832-2844.
8. Buza-Vidas N, Antonchuk J, Qian H, et al. Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes & Dev*. 2006; 20: 2018-2023.
9. Ema H, Sudo K, Seita J, et al. Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and *Lnk*-deficient mice. *Develop Cell*. 2005; 8:907-914.
10. Seita J, Ema H, Ooehara J, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104 (7):2349-2354.
11. Tong W, Lodish FH. Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med*. 2004; 200: 569-580.
12. Tong W, Lodish FH. Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood*. 2005; 105 (12):4604-4612.
13. Takizawa H, Eto K, Yoshikawa A, Nakauchi H, Takatsu K, Takaki S. Growth and maturation

of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol.* 2008; 36 (7):897-906.

14. Baran-Marszak F, Magdoud H, Desterke C, et al.. Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010; 116 (26):5961-5971.

15. Gery S, Qi C, Gueller S, Hongtao X, Tefferi A, Koeffler HP. Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leuk Biol.* 2009; 85: 957-965.

16. Bersenev A, Wu C, Balcerak J, et al. Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest.* 2010; 120 (6):2058-69(6):2058-2069.

17. Lesteven E, Picque M., Canotti C., et al. Association of a Single Nucleotide Polymorphism in the SH2B3 Gene with JAK2V617F-positive Myeloproliferative Neoplasms. *Blood.* 2014; 123(5):794-796.

18. Spolverini A, Pieri P, Guglielmelli P, et al. Infrequent occurrence of mutations in the PH domain of LNK in patients with JAK2 mutation-negative "idiopathic" erythrocytosis. *Haematologica.* 2013; 98 (9):e101-102.

19. Oh ST, Simmonds EF, Jones C, et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010; 116 (6):988-992.

20. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2010; 363(12):1189-1190.

21. Pardanani A Lasho TL, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia.* 2010; 24(10):1713-1718.

22. Ha JS, Jeon DS. Possible new LNK mutations in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol.* 2011; 86(10):866-868.

23. Hurtado C, Erquiaga I, Aranaz P, et al. LNK can also be mutated outside PH and SH2 domains in myeloproliferative neoplasms with and without V617FJAK2 mutation. *Leuk Res.* 2011; 35(11):1537-1539.

24. Perez-Garcia A, Ambesi-Impiombato A, Hadler M, et al. Genetic loss of SH2B3 in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2013; 122(14):2425-2432.

25. Koren-Michowitz M, Gery S, Tabayashi, T, et al. *SH2B3 (LNK)* mutations from

myeloproliferative neoplasms patients have mild loss of function against wild type JAK2 and JAK2 V617F. *Br J Haematol.* 2013; 161(6):811-820.

26. Simon C, Dondi E, Chaix A, et al. Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood.* 2008; 112(10):4039-4047.

27. Albagli-Curiel O, Lécluse Y, Pognonec P, Boulukos KE, Martin, P. A new generation of pPRIG-based retroviral vectors. *BMC Biothechnology.* 2007; 7: 85-98.

28. Li Z, Natarajan P, Ye Y, Hrabe T, Godzik, A. POSA: a user-driven, interactive multiple protein structure alignment server. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42 (Web Server issue):W240-245.

29. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med.* 2007; 356 (5):459-468.

30. Bercovich D, Ganmore I, Scott LM et al. Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukemia associated with Down's syndrome. *Lancet.* 2008; 372: 1484-1492.

31. Kearney L, Gonzalez De Castro D, Yeung J, et al. Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2009; 113(3):646-648.

32. Gery S, Gueller S, Chumakova K, Kawamata N, Liu L, Koeffler HP. Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood.* 2007; 110 (9):3360-3364.

33. Maures TJ, Su HW, Argetsinger LS, Grinstein, S, Carter-Su, C. Phosphorylation controls a dual-function polybasic nuclear localization sequence in the adapter protein SH2B1® to regulate its cellular function and distribution. *J Cell Sci.* 2011; 124: 1542-1552.

34. Long MW, Heffner CH, Williams JL, Peters C, Prochownik EV. Regulation of megakaryocyte phenotype in human erythroleukemia cells. *J Clin Invest.* 1990; 85(4):1072-1084.

35. Li Y, He X, Schembri-King J, Jakes S, Hayashi, J. Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol.* 2000; 164: 5199–5206.

36. Kurzer JH, Saharinen P, Silvennoinen O, Carter-Su C. Binding of SH2-B family members within a potential regulatory region maintains JAK2 in an active state. *Mol Cell Biol.* 2006; 26 (17):6381-6394.

37. Rui L, Gunter DR, Herrington J, Carter-Su C. Differential binding to and regulation of JAK2 by the SH2 domain and N-terminal region of SH2-B®. *Mol Cell Biol.* 2000; 20 (9):3168-3177.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Lnk-NPH region associates with JAK2-WT and MPN pathogenic forms.

(A) Schematic representation of Flag-tagged-Lnk and HA-tagged-JAK2 forms used, showing Lnk and JAK2 functional domains. Lnk structure represents the amino (N)-terminal region (N-term), including a dimerization domain (black rectangle within N-term region), a pleckstrin homology (PH) and Src-homology-2 (SH2) domains. JAK2 functional domains include a FERM domain, Src-homology-2-like (SH2L), pseudo-kinase (JH2) and kinase (JH1) domains. Mutations in JAK2 are shown: K539L (KL), V617F (VF), R683G (RG), K882E (KE), Y613F and Y813F. **(B)** COS7 cells were cotransfected with WT or R364M Lnk forms and different JAK2 tyrosine mutants in a V617F context. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag agarose beads and analysed by Western blot with specific antibodies. The expression level of the different proteins was determined from total cell lysates by immunoblotting with the indicated antibodies. JAK2-VF2F denotes the triple mutant VF/Y613F/Y813F form. Blot is representative of 2 independent experiments. **(C-E)** COS7 cells were cotransfected with Flag-Lnk-WT and either WT or KE JAK2 forms (C), with truncated Lnk forms and KE JAK2 form (D) or with WT or truncated Lnk forms and WT or mutant JAK2 forms (E). Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag agarose beads. Tubulin blot is shown as loading control. Western blot analysis was performed with indicated antibodies. Blots are representative of 5 independent experiments. CTL, control (non-transfected cells); pJAK2, phospho-specific-JAK2; pTyr, phosphotyrosine; pLnk, phosphorylated Lnk

Figure 2. MPN mutations in Lnk-NPH region affect JAK2-WT basal activity and Lnk phosphorylation. **(A)** Schematic representation of Lnk mutations in MPNs, GR, Lnk-G131R, EQ, Lnk-E181Q. JAK2-WT phosphorylation in the presence of EPO cytokine receptor (EPOR) and

WT or mutant Lnk forms in COS7 cells, was measured from total cell lysates (25 μ g) stimulated or not with 50 U/ml of EPO for 10 min. Western blot analysis was done with the indicated antibodies. Tubulin is shown as loading control. **(B)** Cell lysates from (A) were then immunoprecipitated with anti-Flag agarose beads and analysed by immunoblotting with specific antibodies. IgG, immunoglobulin G, are shown as loading control. **(C)** Total lysates from COS7 cells expressing control vector or Flag-Lnk forms with JAK2-V617F and EPOR were stimulated with EPO (50 U/mL) for 10 minutes and then immunoprecipitated with anti-Flag agarose beads. Western blot analysis was performed with anti-pTyr and anti-phospho-JAK2 specific antibodies. JAK2 and Lnk expression were detected with anti-JAK2 and anti-Lnk specific antibodies, respectively. Equal expression of transfected proteins is shown in total cell lysates using tubulin as loading control. White space gaps in lysates panel indicate repositioned gel lanes. **(D)** Schematic representation of WT and mutant Lnk forms cloned into the MIG retroviral vector. Dimerization domain is represented by the black rectangle in the N-term region. Point mutations in the different domains are indicated with an asterisk (*). Lnk-R364M (RM) is a synthetic SH2 domain inactivating mutation. HEL cells retrovirally infected with supernatants expressing control vector or Lnk constructs were immunoprecipitated with anti-Lnk antibodies. Western blot analysis was performed as described above. Anti-JAK2 immunoprecipitation is shown as control for JAK2 size. All blots are representative of 2-3 independent experiments.

Figure 3. The N-terminal and PH domains of Lnk contribute to Lnk dimerization and subcellular localization. (A) COS7 cells were cotransfected with Flag-tagged WT or mutated Lnk forms and Myc-tagged WT Lnk. Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with anti-Flag agarose beads. Western blot analysis was performed with anti-Myc antibodies. Blot is representative of 2

independent experiments. GR, Lnk-G131R, EQ, Lnk-E181Q. NT, N-terminal **(B)** Cytosolic and membrane fractions were purified from TPA-treated HEL cells (6×10^6) expressing vector, WT or mutated Lnk forms. Lnk subcellular localization was examined by immunoblotting with anti-Lnk antibodies. Tubulin and flotillin were used as cytoplasmic and membrane markers, respectively. Representative blot from 2 independent experiments is shown. **(B)** HEL cells (5×10^4) expressing the different Lnk forms were grown on fibronectin-coated coverslips and TPA-treated for 24 hours, stained with anti-Lnk antibodies followed by Alexa-647-conjugated anti-rabbit secondary antibodies and analysed by confocal microscopy. Intensities of fluorescent signals were quantified in cytoplasm and membrane regions defined as ROI (Region of Interest) and averaged from 30 cells for each Lnk form from 3 independent experiments. Representative images are shown. The graphs indicate the relative proportion of fluorescence intensity quantified in the cytoplasm (Cyt,■) and plasma membrane (PM,□) regions for each Lnk form. Scale bar = 10 μm

Figure 4. Structure-based sequence alignment of the LNK-PH with selected PH domains.

Residue numbering and secondary structure for mouse APS are indicated above the alignment. PH domain borders are delineated by brackets. Identical residues are shaded red and highly conserved residues are in red type. Residue E208 of LNK located within the 1-2 loop is in green. Lnk-PH mutations found in MPNs are indicated and pointed with a black arrow (E208Q, S213R, A215V, G220R/V, A223V, G229S, D234N, T274A), the 5 bp-deletion is denoted with a triangle (Δ) and the SNP rs3184504 (R262W) is highlighted in purple. Black squares (■) mark PH-domain residues implicated in lipid head group interaction. Protein Data Base (PDB) entries 1V5M (APS), 1U5G (Skap55-homolog, SKHom), 1U5D (Src-kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa, Skap55,

SK55), 1H10 (AKT) and 1BTK (Bruton's tyrosine kinase, BTK) were used to align PH domain structures using the POSA software. The positions of α -sheets and α -helix are derived from the APS structure. S, serine; A, alanine; V, valine; D; aspartic acid; N, asparagine; T, threonine; W, tryptophan.

Figure 5. Lnk-NPH region contributes to the expansion of megakaryocytic progenitors via regulation of TPO-induced signaling pathways. (A) Total RNA was extracted from $Lnk^{+/+}$ or $Lnk^{-/-}$ Lin⁻ GFP⁺ progenitor cells transduced with either vector alone, WT or mutant forms of Lnk and subjected to RT-PCR with specific primers for *Lnk* (top panel) and *HPRT* (bottom panel) as control. (B) $Lnk^{+/+}$ or $Lnk^{-/-}$ Lin⁻ transduced cells were assessed for their *in vitro* colony-forming ability of megakaryocytic progenitors in collagen-based media containing optimal concentrations of appropriate recombinant growth factors. Data represent the mean \pm SD (error bars) of number of CFU-Meg colonies/ 10^4 Lin⁻ GFP⁺ cells from duplicate samples from 3 independent assays using 5-6 mice of each genotype. Statistical significance was determined using Student *t* test: ****P*0,003. (C) Typical appearance of GFP⁺ megakaryocyte colonies from $Lnk^{-/-}$ Lin⁻ progenitors transduced with Lnk-WT, mutants or vector control. $Lnk^{+/+}$ Lin⁻ progenitors were transduce with vector alone. CFU-Meg colonies were acquired with a 10X objective with an Olympus BX41 microscope and a camera (Bassler 102FC). Images were processed with ImageJ software. Scale bar = 50 μ m. (D) $Lnk^{+/-}$ Lin⁻ GFP⁺ progenitor cells transduced with either vector alone, WT or mutant forms of Lnk were assessed for their *in vitro* colony-forming ability of megakaryocytic progenitors. Data represent the mean \pm SD (error bars) of number of CFU-Meg colonies/ 10^4 Lin⁻ GFP⁺ cells from duplicate samples from 2 independent assays using 5-6 mice of each genotype.

Figure 6. Mutations in Lnk-NPH region abolishes Lnk-mediated cell growth and signaling inhibition in HEL cells. (A) HEL cells (3×10^5) expressing vector (×), Lnk-WT (○) or mutant (GR, ▲; EQ, ◇; RM, □) forms were cultured in complete media and viable cell numbers were determined by trypan blue exclusion at the indicated times. Data represent the mean counts \pm SD (error bars) of viable cells from triplicate determinations from 3 independent experiments. Statistical significance was determined using Student *t* test: $**P 10^{-6}$; $*P 0,02$ (B) JAK2, STAT5 and ERK activation was assessed in total lysates from HEL cells expressing control vector or Lnk mutant forms by immunoblotting with anti-phospho-specific antibodies. Total protein levels were analysed by immunoblotting. Tubulin blot is shown as loading control. Blot quantification was performed with ImageLab software (Biorad). Numbers under total proteins blots show normalized ratios of phosphorylated proteins/total protein. Blots are representative of 2 independent experiments.

Figure 7. Working model of Lnk inhibition of JAK2. (A) In a physiological context, LNK associates, through its N-terminal region (NT) with inactive JAK2 at basal state (1). In this way, LNK maintains JAK2 activity low at basal level (2). Cytokine-stimulation triggers JAK2 transphosphorylation and activation, followed by dissociation of Lnk-JAK2 complex and thereby upregulation of JAK2-mediated functions (3). Signaling inhibition occurs with the association of LNK-SH2 domain with active JAK2, at the plasma membrane (4), leading to phosphorylation of the adaptor (5); this complex could be further stabilized by LNK dimerization domain (6), which results in down-regulation of JAK2 biological responses (7). (B) In contrast, MPN mutations in LNK (G152R left, yellow star; E208Q, right, orange star) change its interaction with JAK2, leading to activation of the kinase and Lnk phosphorylation, both at basal and cytokine-stimulated

conditions (8 and 10). This is probably favored by their abnormal subcellular localization (9 and 11). Both mutations affect LNK inhibitory capacity, thereby evoking upregulation of JAK2-mediated proliferation.

SUPPLEMENTAL DATA

MATERIAL AND METHODS

Cell transfection

Platinum-E (Plat-E¹) cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 1% Pen/Strep (Life technologies), blasticidin (1:1000) and puromycin (1µg/mL, Sigma) at 37°C in 5% CO₂. COS7 and Plat-E cells were transiently transfected at 70% confluency using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Retroviral supernatants from Plat-E cells transfected with MIG vector or different Lnk forms were collected at 48 and 72 hours post-transfection, filtered (0.45 µm pore) and infected by spinoculation at 3000 rpm for 2 hours at 33°C. For COS7 cells, culture medium was changed 16 hours after transfection, then cells were starved in serum-free media for 12 hours and stimulated with 50 U/mL of human EPO (Roche) for 10 minutes.

Antibodies

The following antibodies were used: anti-NLnk⁵ and anti-Lnk68 (raised against Lnk-PH domain), anti-pJAK2 (Tyr1007/1008), anti-JAK2, anti-pERK1/2 (Thr202/Thr204), anti-pSTAT5 (Tyr694), anti-STAT5 (Cell Signalling Technology), anti-Erk1 (K-24, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-Tyrosine (clone 4G10 Platinum, Millipore), anti-CD61 (BD Biosciences), anti-Flag M2 and anti-tubulin (Sigma-Aldrich). Anti-Flag agarose beads (Sigma) were used for anti-Flag immunoprecipitation experiments.

Proliferation Assay

HEL cells (3×10^5) were seeded in triplicate in 12-well plate in complete media and viable cell numbers were determined by trypan blue exclusion at indicated times.

Phospho-flow cytometric analysis

UT7/Mpl cells were starved overnight, stimulated or not with 100 ng/ml of TPO for 30 minutes, fixed with 2% of paraformaldehyde and finally permeabilized with 95% cold methanol. GFP+ cells were gated and then stained with anti-pJAK2, anti-pERK1/2, anti-pSTAT5, followed by anti-rabbit IgG secondary antibodies conjugated to Alexa-Fluor-647 (Molecular Probes) and analysed on a FACS Canto II (Becton Dickinson) and FlowJo software (Tree Star).

SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure S1. Expression level of JAK2 and Lnk forms. COS7 cells were cotransfected with WT or truncated Lnk forms and WT or pathogenic JAK2 forms and their expression level was assessed by Western blot analysis with indicated antibodies. Control (CTL) indicates non-transfected cells. Tubulin is shown as loading control.

Supplementary Figure S2. TPA induces megakaryocyte-like phenotype on HEL cells. (A) Cytosolic and membrane fractions from HEL cells expressing vector, WT or Lnk mutated forms were treated with TPA (15 nM) for 24 hours and then examined by immunoblotting with anti-CD61 antibodies, a surface marker of megakaryocytes. Nuclear lobulation and cell morphology changes were analyzed by staining with DAPI (left panel) and Alexa 546-conjugated phalloidin (right panel), respectively. Representative confocal images are shown. Scale bar = 10 μ m. **(B)** Lnk subcellular localization in HEL cells expressing vector, WT or Lnk mutated forms was examined

in the absence of TPA treatment. Cytosolic and membrane fractions were analyzed by immunoblotting with anti-Lnk antibodies. Tubulin and flotillin are used as cytoplasmic and membrane markers, respectively.

Supplementary Figure S3. Schematic diagrams of homology models of the human LNK PH domain. Diagrams are based on various PDB entries and built with the online available Swiss Model Software. **(A)** Homology model based on PDB entry 2I5F (C-term PH domain of pleckstrin in complex with D-myo-Ins (1,2,3,5,6) P5). The fold of the protein comprises a seven-stranded beta-barrel (blue) capped by a α -helix (red). The significant Glutamic acid (E) 208 residue is shown in CPK representation. **(B)** Homology model based on the PDB entry 1V5M (APS). The E208 residue is localized within the α -3 helix in a site essential for interaction of PH domain with phosphoinositides.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Morita S, Kojima, T., Kitamura, T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Therapy*. 2000; 7(12):1063-1066.

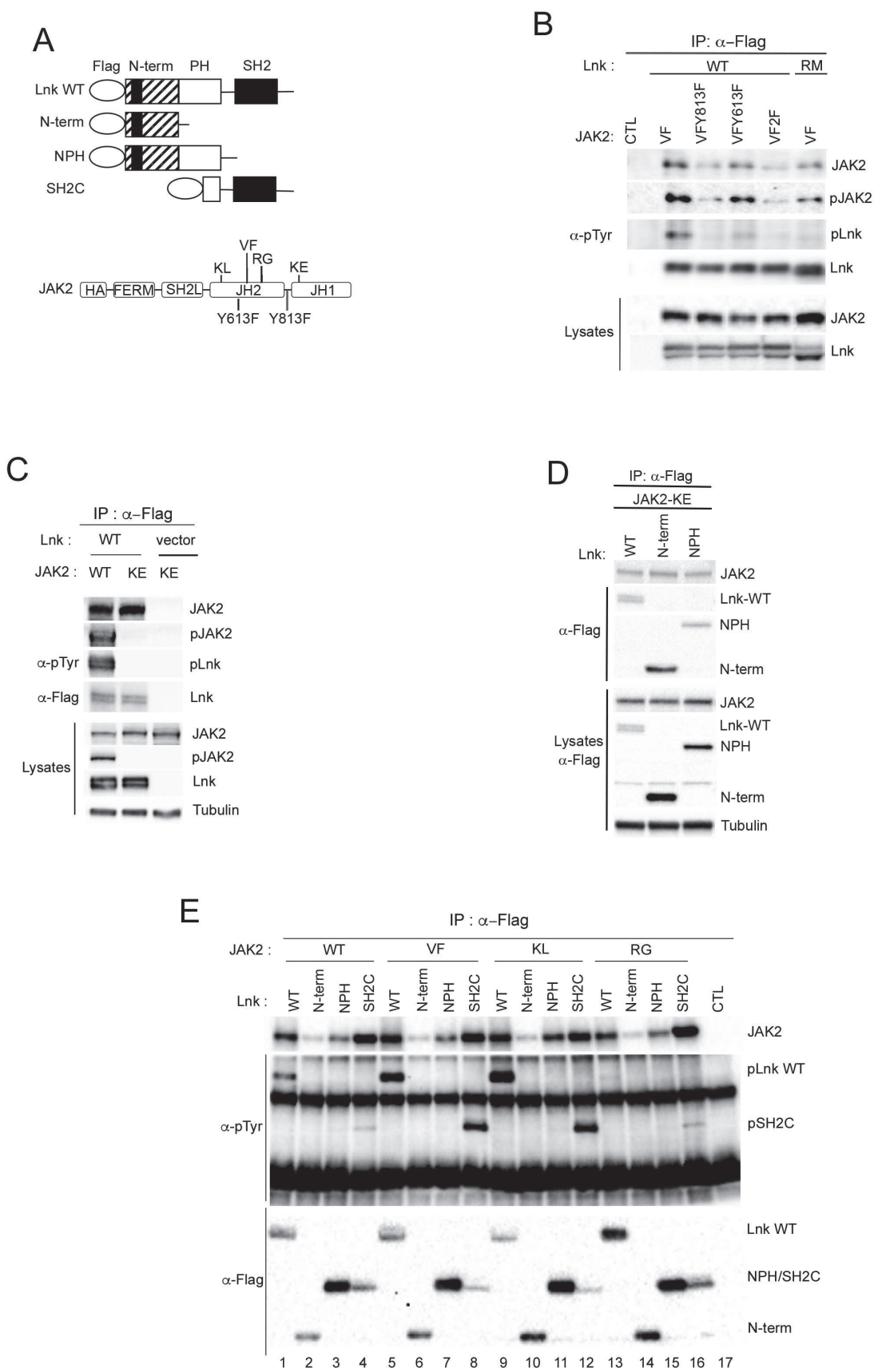


FIGURE 1 H. Magdoud et al.

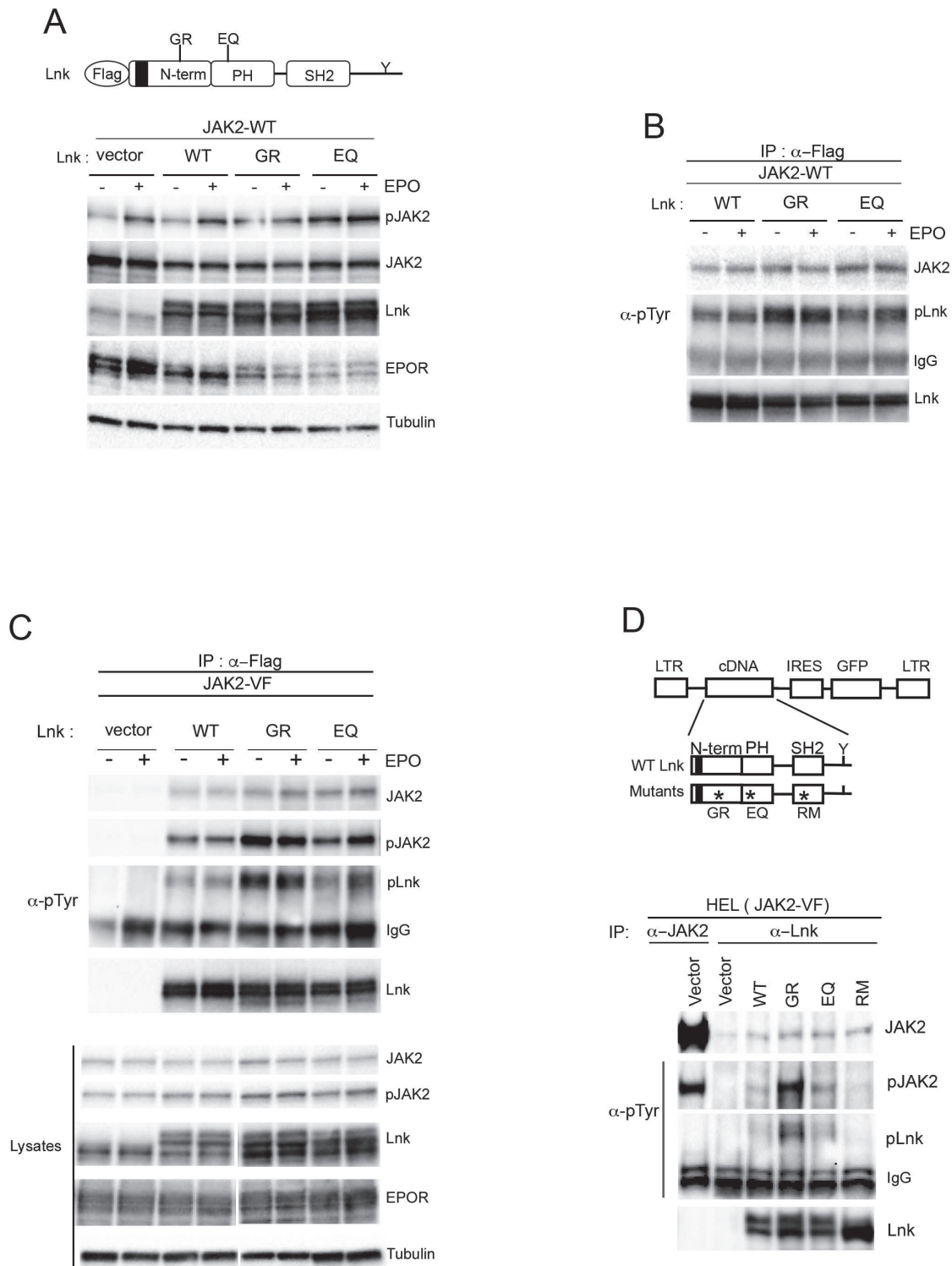
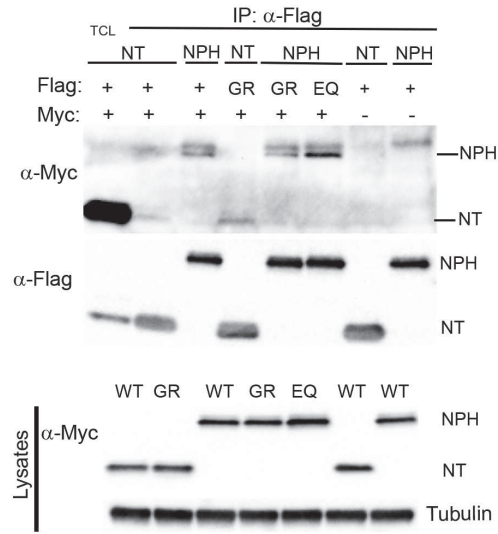
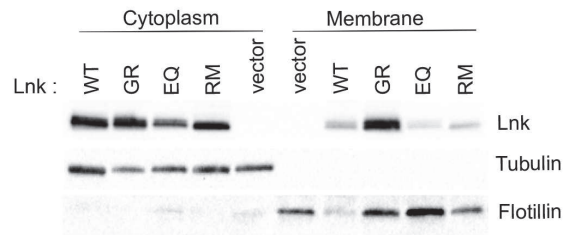


FIGURE 2 H. Magdoud et al.

A



B



C

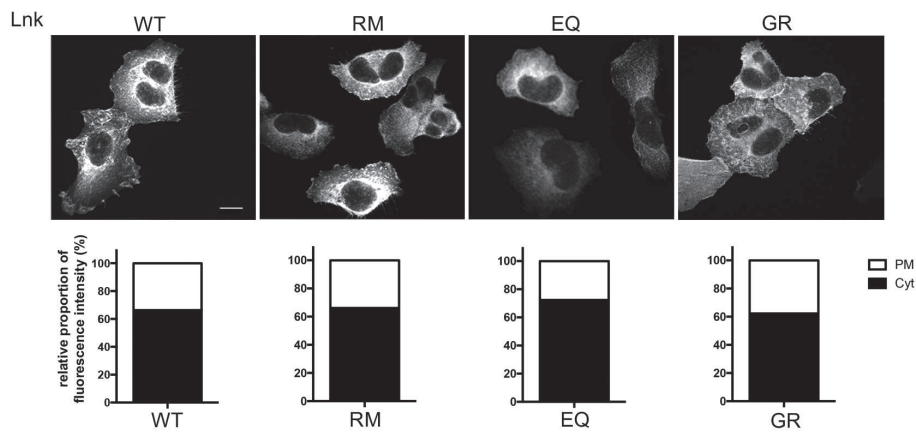


FIGURE 3 H. Magdoud et al.

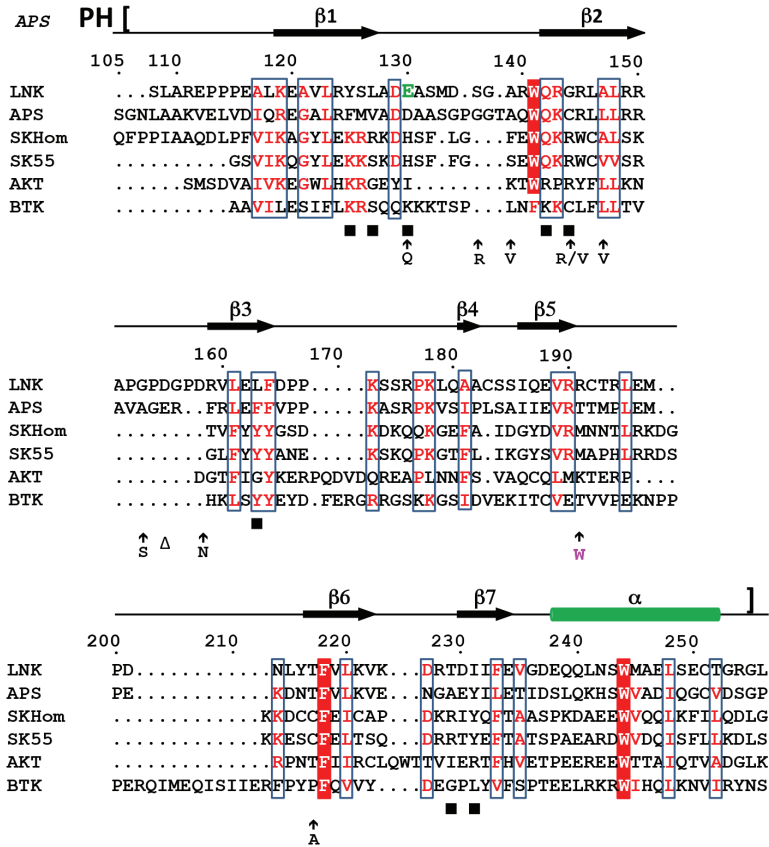


FIGURE 4 H.Magdoud et al.

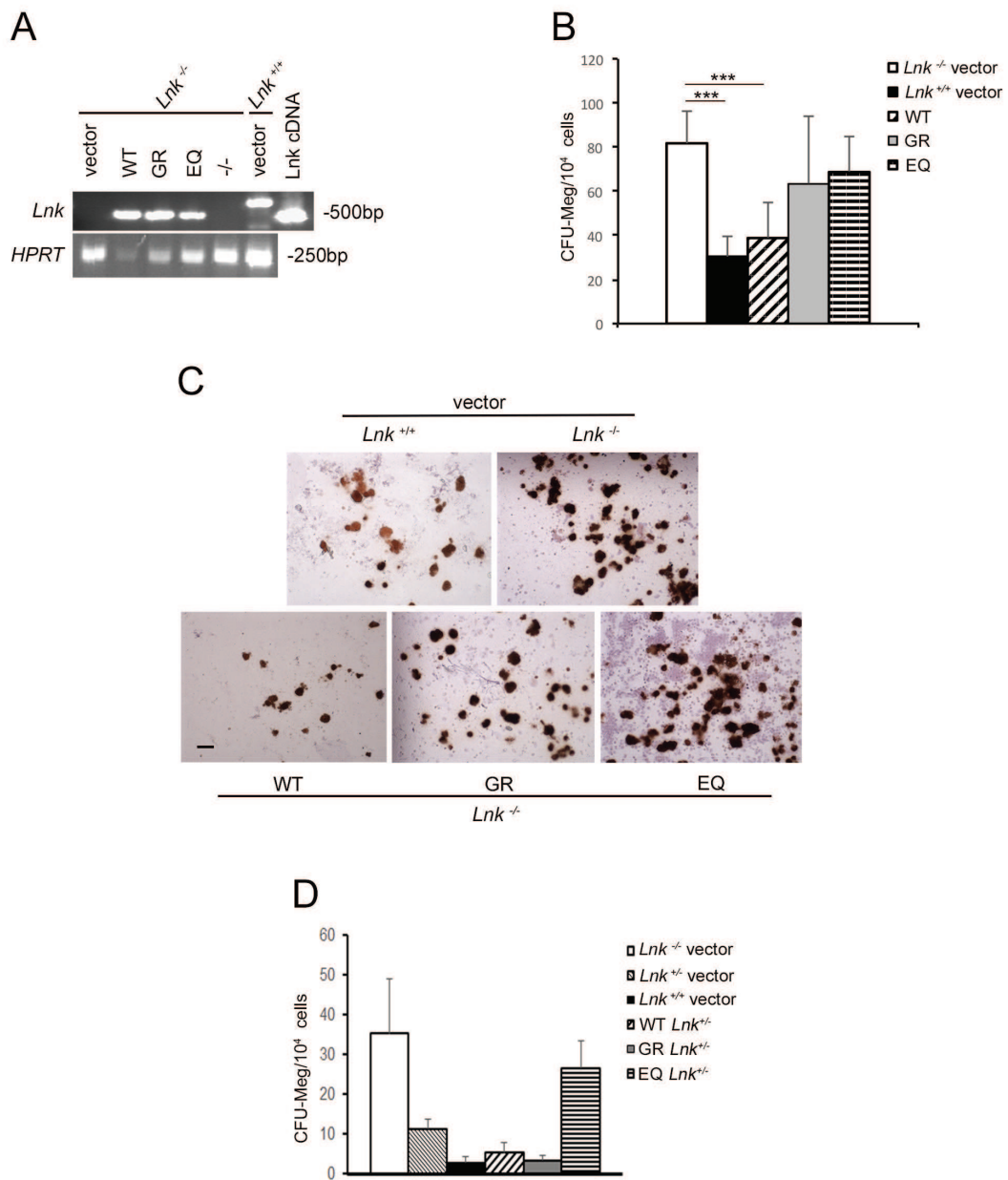
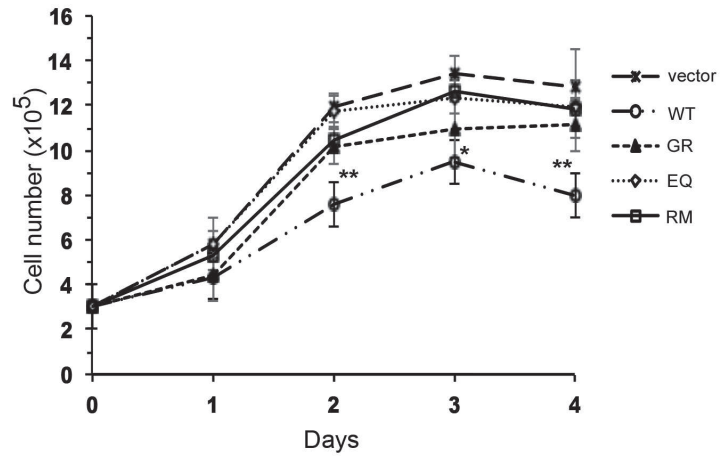


FIGURE 5 H. Magdoud et al.

A



B

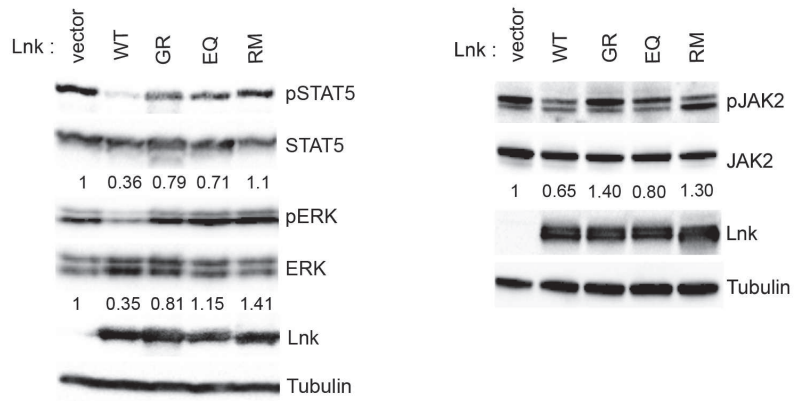


FIGURE 6. H. Magdoud et al.

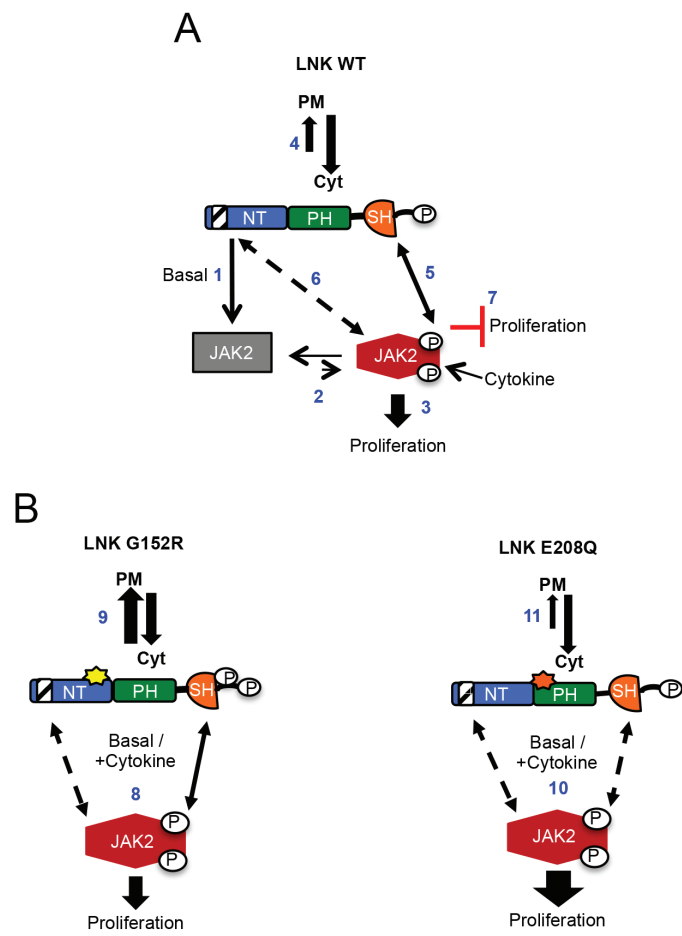


FIGURE 7 H. Magdoud et al

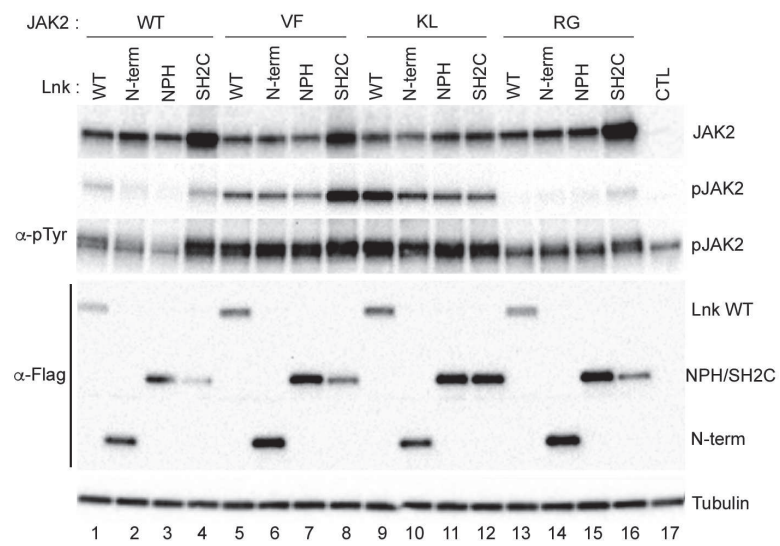


FIGURE S1 H. Magdoud et al.

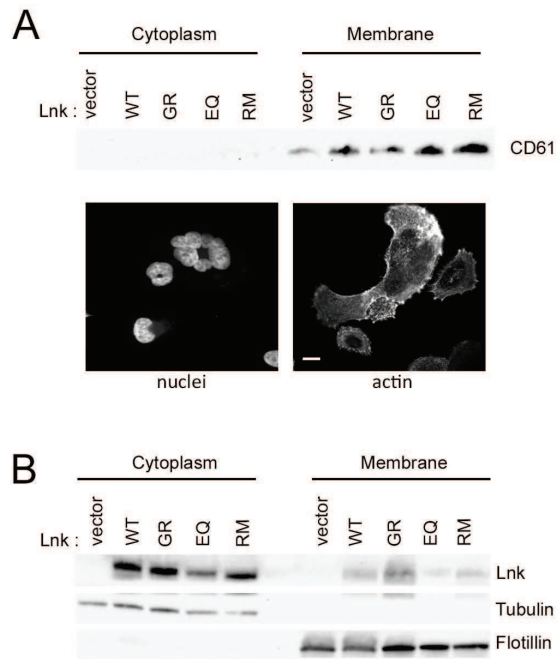
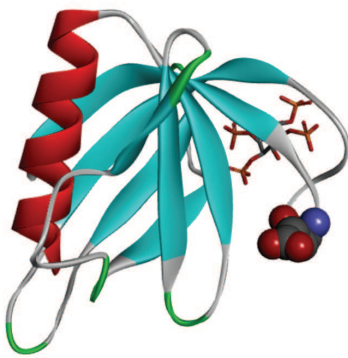


FIGURE S2 H. Magdoud et al.

A



B

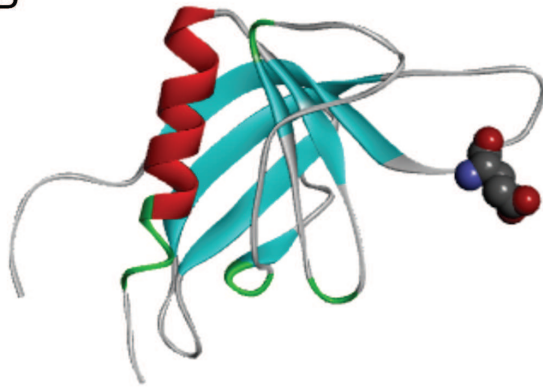


FIGURE S3 H. Magdoud et al.

II. Résultats complémentaires : Utilisation de LNK comme outil thérapeutique

Nous avons mis en évidence l'importance de la région NPH dans la fonction inhibitrice de l'adaptateur, ainsi que sa capacité à se lier et réguler JAK2-V617F. Cette région pourrait donc être utilisée comme inhibiteur spécifique de cette forme mutée de JAK2. De ce fait, le deuxième axe de mon projet de thèse a consisté à développer une stratégie permettant d'utiliser la région NPH de LNK pour cibler spécifiquement JAK2-V617F. Cette approche a donc été développée à l'aide des peptides pénétrants (CPP), capables d'être internalisés par les cellules. Nous avons choisi d'utiliser deux méthodes différentes de liaison du CPP à son cargo. La première méthode consiste à utiliser des CPP-TAT liés de manière covalente à la région NPH de LNK et la deuxième consiste à lier cette région de LNK de manière non-covalente à un cocktail de CPP. Ces deux approches présentent des avantages techniques et biologiques différents.

Dans la première méthode, les CPP-TAT sont directement fusionnés à leur cargo, qui sont dans notre cas, les différentes formes tronquées de LNK. Au niveau technique, cette méthode permet d'éliminer l'étape de formation du complexe CPP-cargo avant leur internalisation dans les cellules. Cette étape du protocole requiert un ratio CPP/cargo spécifique pour favoriser l'internalisation optimale du cargo. L'utilisation de ce CPP présente aussi plusieurs avantages biologiques. En effet, cette liaison covalente CPP-TAT-cargo diminue le risque de perdre le cargo lors de son acheminement vers sa cible. En revanche, le CPP pourrait également empêcher par encombrement stérique ou par modification des propriétés physico-chimiques, la fonction du cargo.

En ce qui concerne la deuxième méthode, l'utilisation d'un cocktail de CPP apporte plusieurs avantages biologiques dont une liaison CPP-cargo avec un rendement plus élevé. Cependant, ceci nécessite une étape technique supplémentaire pour déterminer le ratio CPP-cargo optimal. Cette technique permet également de cibler plusieurs mécanismes d'entrée dans la cellule. En effet, le cocktail CPP contenant différents peptides, déclenche plusieurs voies d'internalisation, ce qui pourrait permettre au cargo d'échapper à la dégradation endosomale. Néanmoins, le fait de se lier de manière non-covalente à leur cargo, augmente la probabilité de le perdre, avant même qu'il atteigne sa cible, par rapport à la première technique. Par ailleurs, ceci peut aussi être un avantage si, lorsque le complexe CPP-cargo est internalisé, le CPP libère le cargo, lui permettant ainsi d'atteindre sa cible et d'exercer sa fonction sans encombrement. De ce fait, nous avons choisi de développer ces deux méthodes, en parallèle, afin de comparer leurs fonctionnalités, pour en déterminer l'approche la plus appropriée. De plus, les CPP peuvent aussi induire une certaine toxicité. D'après l'étude de Jones et son équipe, le CPP-TAT présente une efficacité d'internalisation moins élevée que les CPP-polyarginine ou pénétatine. Cependant, le CPP-TAT semble être moins toxique que les CPP transportane, polyarginine et pénétatine (Jones et al., 2005). Ce point est très important dans l'éventuelle utilisation des CPP-TAT pour le traitement des patients atteints de NMP.

A. Stratégies expérimentales

1. Constructions utilisées

Les plasmides pEcoli-Cterm 6xHN (référence PT3869-5 de Clontech) et le plasmide pTAT-HA (référence 35612 de Addgene) ont été utilisés pour cloner les formes tronquées de LNK (région N-terminale (Nter) ; région N-terminale incluant le domaine PH (NPH) et le domaine SH2 (SH2) (Figure 34). Le plasmide pEcoli-Cterm 6xHN contient un promoteur T7 qui induit la transcription de l'ADN après stimulation par l'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). La présence des séquences codant pour les étiquettes histidine (His) et HA (dérivée de la protéine hémagglutinine) sur ces plasmides, permet à la fois la purification des protéines produites mais aussi leur immunoprécipitation et détection. Dans les plasmides pEcoli, les résidus histidine (H) sont séparés par des résidus asparagine (N). Cette étiquette présente plusieurs avantages, comparée à l'étiquette 6xH du plasmide TAT. Elle possède une meilleure solubilité et une meilleure exposition de l'étiquette, permettant une détection plus efficace. Cependant, elle est moins adéquate pour l'internalisation des protéines puisqu'elle contient 12 acides aminés au lieu de 6 dans le plasmide TAT, ce qui augmente la taille du complexe CPP-cargo. Le plasmide TAT contient aussi un promoteur T7, permettant l'auto-induction des protéines en présence de lactose. Ces deux plasmides contiennent également, le gène de résistance à l'ampicilline.

2. Production des protéines

Protéines LNK-His

Des bactéries BL21, très utilisées pour l'expression et la production des protéines, ont été transformées par les plasmides pEcoli contenant les différents domaines de LNK. Ces bactéries transformées ont été mis en culture dans 5mL de milieu Lysogeny Broth (LB) contenant l'antibiotique, sur la nuit à 37°C, avec agitation. Au lendemain matin, la culture a été diluée au 1/100 dans du milieu LB (37°C, avec agitation). Lorsque cette culture a atteint une densité optique de 0,6 à 600 nm, la production des protéines est induite avec 1 mM d'IPTG durant 1 heure à 37°C avec agitation. La culture est ensuite centrifugée et le culot, lysé avec du tampon Xtractor contenant des inhibiteurs de protéases, selon le protocole fournit par les laboratoires Clontech (référence PT3735-1). Les protéines ont ensuite été purifiées à l'aide de leur étiquette Histidine reconnue par les billes de nickel (Ni-NTA agarose, référence : 30210 de Qiagen) puis éluées par un tampon d'éluion et concentrées (filtres concentrateurs, molecular weight cut off (MWCO) 10K, Millipore). Les protéines produites sont appelées Nter-His, NPH-His et SH2-His.

- tampon d'éluion : 50 mM sodium phosphate monobasic, 300 mM sodium chloride, 300 mM imidazole, pH 8

Protéines LNK-TAT

En ce qui concerne la production de ces protéines, des bactéries BL21 ont été transformées avec les plasmides pTAT contenant les différents domaines de LNK. Ces bactéries transformées ont ensuite été mises en culture dans 5 ml de milieu Terrific Broth, sur la nuit à 37°C avec agitation. Au lendemain matin, la culture a été diluée au 1/1000 en rajoutant au milieu de culture des additifs (composition ci-dessous) durant 5 heures à 37°C avec agitation. Après ces 5 heures, la culture est laissée sur la nuit à 25°C à avec agitation, pour l'auto-induction des protéines. Le lendemain, la culture est centrifugée et lysée par sonication avec un tampon de lyse. La purification des CPP se fait avec les mêmes billes de nickel et sont ensuite éluées et concentrés (filtres concentrateurs Millipore). Les protéines produites par cette méthode sont appelées Nter-TAT, NPH-TAT et SH2-TAT.

- Milieu Terrific Broth : pour 1 litre de milieu : 12g tryptophane, 24g glucose anhydrous, 9,4g potassium phosphate monobasic, 2,2g potassium nitrate
- Additifs pour l'auto-induction: 50 mM sodium phosphate dibasic, 50 mM potassium phosphate dibasic, 25mM ammonium sulfate, 2mM magnesium sulfate, 0,5% glycerol, 0,2% Lactose
- Tampon de lyse : 20mM Trizabase, 400mM NaCl, 10mM Imidazole, 1% Sarkosyl, 1% Triton Tx-100, 2µl/ml DNase I, inhibiteur de protéases, pH = 7.4
- Tampon d'éluion : 20mM Trizabase, 400mM NaCl, 300mM Imidazole, pH = 7,4

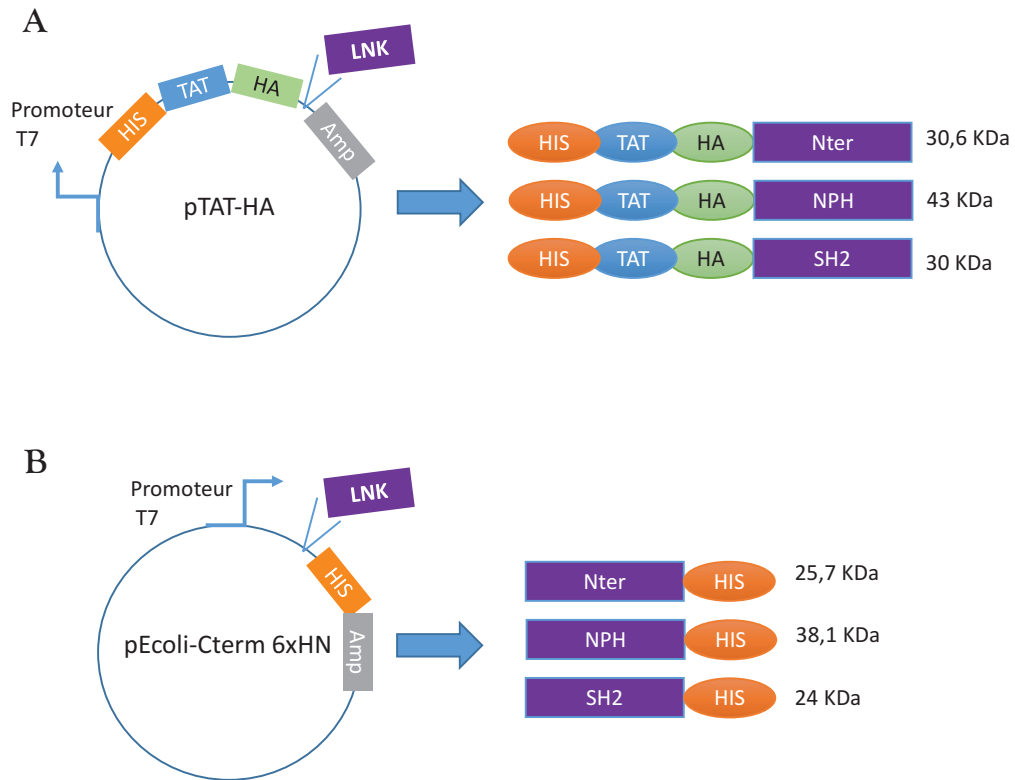


Figure 34 : Représentation schématique des plasmides utilisés et des protéines obtenues

A gauche représentation du plasmide ; à droite : protéines obtenues. A) protéines issues du plasmide pTAT-HA. B) protéines issues du plasmide pEcoli-Cterm 6xHN. Etiquette HA, histidine (HIS) ; peptide CPP TAT (TAT) ; gène de résistance à l'ampicilline (Amp).

3. Méthodes expérimentales

a. Western blot et Immunoprécipitation

Les immunoprécipitations ont été réalisées avec les billes d'agarose couplées aux anticorps anti-His ou anti-Lnk-SH2 (anticorps fait par notre équipe avec un épitope reconnaissant le domaine SH2 de LNK). Les protéines ont été détectées par les anticorps anti-histidine (clone HIS-1, H1029), anti-HA (clone HA-7 ; H3663) et anti-Lnk-SH2.

b. Transduction et visualisation des protéines des CPP

Le kit de JenaBioscience possède un peptide contrôle, déjà couplé à un fluorochrome, appelé Atto488-BSA (Bovine Serum Albumine), que nous avons utilisé pour les premiers tests. Des cellules COS7 (cellules adhérentes), ont été ensemencées dans des plaques de culture de 24 puits à $2,5 \cdot 10^4$ cellules par puit, avec du milieu DMEM contenant du sérum et des antibiotiques, la veille de la transduction. Elles doivent être au maximum au troisième passage, pour une meilleure transduction par les CPP. Le lendemain, les quantités nécessaires de cocktail de CPP et de peptide Atto488-BSA ont été chacune diluées dans 20 μL de « phosphate buffered saline » (PBS), ces tubes ont été mixés et incubés, durant 30 minutes à 37°C , afin de favoriser la formation des complexes CPP-cargo. Durant ce temps, les cellules, maintenant à environ 70% de confluence, ont été rincées trois fois avec du PBS. Après les 30 minutes d'incubation, nous avons déposé sur les cellules 80 μL de milieu DMEM sans sérum, les complexes CPP-cargo et 10% de DMSO, 1% de BSA, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'Aprotinine et 1mM de o-phenantroline. Le DMSO permet d'augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire, la BSA permet d'éviter des dégradations enzymatiques et améliore l'efficacité de transduction, l'aprotinine et o-phenantroline sont des inhibiteurs de protéases. Les cellules sont incubées durant 1h à 37°C . Puis, nous ajoutons de milieu 200 μL DMEM et 120 μM de chloroquine (24h à 37°C). La chloroquine permet la déstabilisation des vésicules créées lors de l'internalisation des CPP, leur permettant ainsi d'en sortir. Avant visualisation au microscope, trois lavages au PBS avec de la Glycine pH3 ont été effectués, afin d'éliminer les CPP restés dans le milieu ou à la surface cellulaire. Ce protocole provient de Jena Bioscience pour le kit CPP-S01 et a été modifié pour optimiser l'internalisation des CPP, en fonction de la taille des plaques de culture utilisées et des tests réalisés (Figure 35).

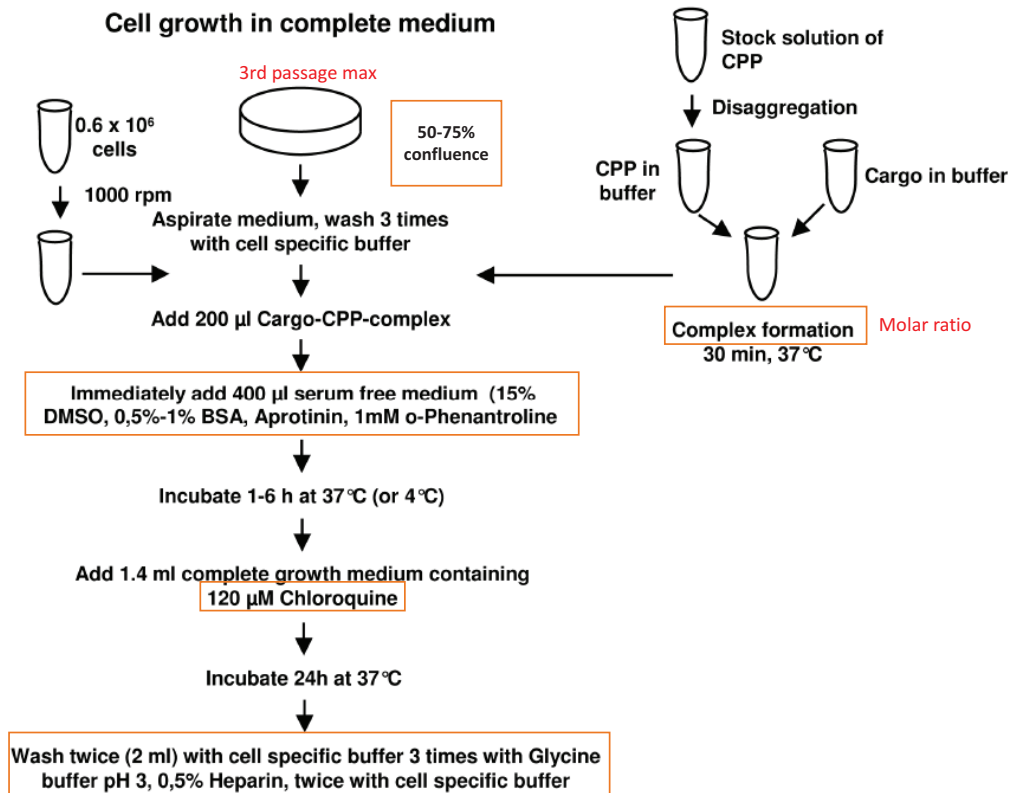


Figure 35 : Protocole d'internalisation des CPP

Représentation schématique du Protocole de Jena Bioscience pour le kit CPP-S01. Les étapes écrites ou encadrées en rouge sont les plus critiques à la réalisation de cette expérience et celles dont les paramètres changent selon les CPP, cargo et cellules utilisés. D'après le site de JenaBioscience.

B. Résultats préliminaires

1. Production des protéines recombinantes

Nous avons commencé par produire les protéines SH2-His et SH2-TAT. Les protéines ont été visualisées dans des gels de polyacrylamide colorés au bleu de coomassie, ce qui a permis de valider la production de nos protéines à la taille attendues et de contrôler leur pureté (Figure 36). La présence d'une protéine plus concentrée dans le gel de la protéine SH2-TAT suggère une production plus importante de celle-ci par rapport à la protéine SH2-His. Cependant, cette différence de production est possiblement due à la quantité de culture utilisée au départ pour chaque protéine (20 ml pour SH2-His et 50 ml pour SH2-TAT). Dans les deux cas, la plupart des protéines sont éluées dès la première élution. Néanmoins, notre protocole d'élution des billes ne permet pas de récupérer la totalité des protéines produites, comme démontré par la migration d'un échantillon des billes de nickel après l'élution des protéines (Figure 36, puit « billes »). Dans le gel de la protéine SH2-His, deux bandes apparaissent et la plus haute est plus concentrée. Afin de déterminer quelle bande correspond à notre protéine SH2-His, nous avons analysé cet échantillon par des expériences d'immunoempreinte avec des anticorps anti-Lnk-SH2, confirmant que cette bande correspond bien à notre protéine SH2-His (Figure 37). La protéine n'a pas pu être détectée avec l'anticorps anti-His après une réhybridation de la membrane. En ce qui concerne la protéine SH2-TAT, trois bandes se trouvent au niveau du poids moléculaire attendu. Seule la bande la plus haute est détectée en western blot lors de l'hybridation de la membrane par les anticorps anti-His, anti-HA et anti-SH2 (Figure 38). Toutefois, nous avons eu plus de mal à détecter la protéine avec l'anticorps anti-His, ceci peut être due au masquage de l'épitope ou alors à une mauvaise affinité de l'anticorps pour cette étiquette His.

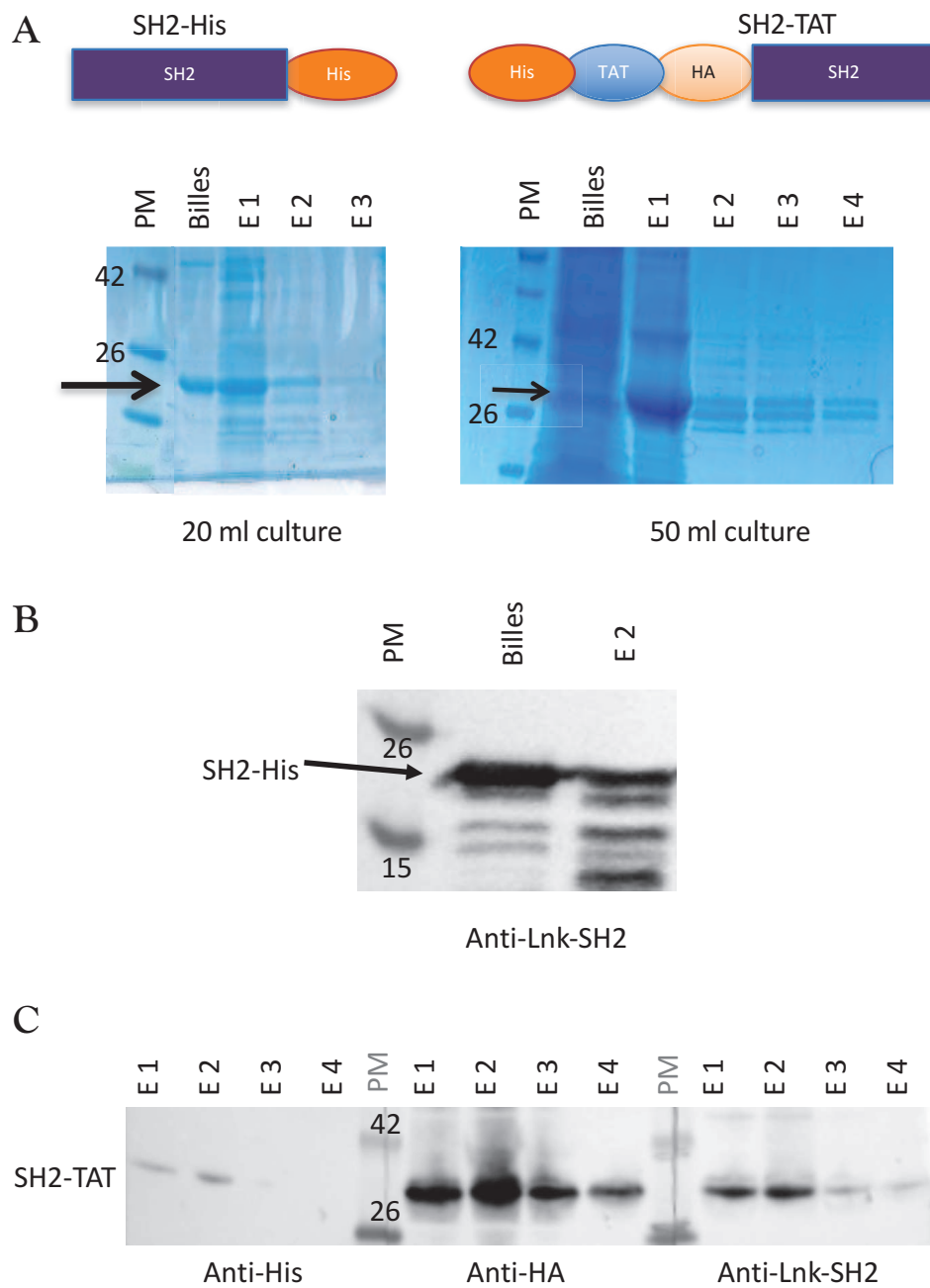


Figure 36 : His-SH2 et TAT-SH2, vérification de la production et de l'éluion

A) Les protéines SH2-His et SH2-TAT ont respectivement été produites à partir de 20ml et 50ml de culture. La ligne billes correspond à un échantillon des billes de nickel après l'éluion des protéines. B) Analyse des protéines SH2-His produites par immunoempreinte. C) Analyse des protéines SH2-TAT produites par immunoempreinte. Hybridation des membranes avec les anticorps anti-Lnk-SH2, anti-His ou anti-HA. Les quatre premiers éluats (E) des billes de nickel sont représentés. Les flèches indiquent la protéine produite. Marqueur de poids moléculaire (PM)

2. Interaction entre JAK2 et les protéines recombinantes

Afin de déterminer si les protéines solubles produites sont fonctionnelles après purification, nous avons examiné leur capacité d'internalisation avec JAK2. Puisque l'interaction LNK/JAK2 par le domaine SH2 de LNK est plus importante, nous avons utilisé ce domaine comme contrôle positif. Pour cela, les cellules COS7 ont été transfectées avec les plasmides JAK2-WT ou JAK2-V617F et les lysats des cellules transfectées ont été incubés avec 8 µg de protéines SH2-His ou SH2-TAT pendant 2 h à 4°C avec rotation. Leur capacité d'interaction avec JAK2 a été évaluée par immunoprécipitation avec des anticorps anti-His et anti-Lnk-SH2 (Figure 39). Aucune interaction entre SH2-His ou SH2-TAT et les formes de JAK2 n'a été détectée. Ce résultat peut être dû à une quantité inadéquate des protéines SH2-His et SH2-TAT solubles, utilisée dans l'immunoprécipitation ou bien à la présence d'imidazole qui pourrait empêcher l'interaction entre le domaine SH2 de LNK et JAK2. La dialyse des protéines solubles serait nécessaire afin de changer le tampon en une solution plus neutre et favorable à la co-immunoprécipitation de LNK/JAK2.

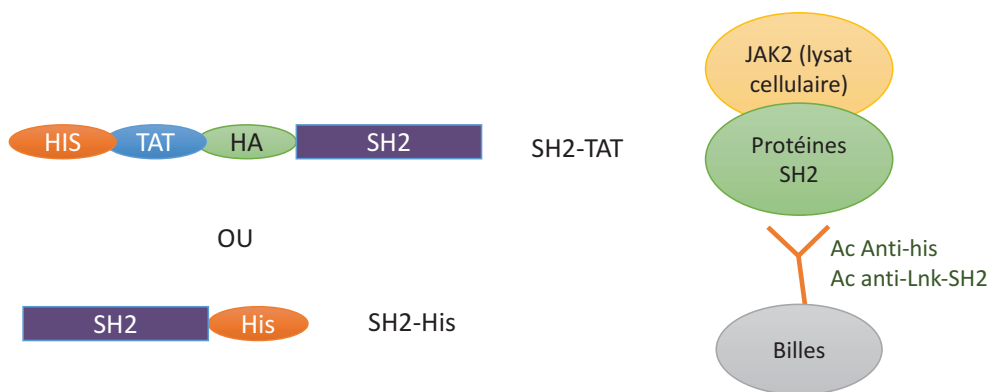


Figure 37 : Schéma explicatif de l'immunoprécipitation entre JAK2 et les protéines recombinantes LNK

Représentation schématique des protéines SH2-TAT et SH2-His. Incubation des lysats cellulaire de COS7 exprimant JAK2-WT ou JAK2-V617F avec les protéines LNK recombinantes puis immunoprécipitation avec des anticorps (Ac) anti-histidine (His) ou anti-Lnk-SH2.

3. Internalisation des protéines recombinantes

L'internalisation des protéines recombinantes par les cellules dépend de plusieurs paramètres dont le type cellulaire, l'état des cellules, le CPP et le cargo utilisé. Elle dépend aussi des conditions d'expérimentation telles que la température de la réaction et la concentration des réactifs. En parallèle des immunoprécipitations, nous avons commencé à faire les mises au point des expériences d'immunofluorescence avec le peptide contrôle Atto488-BSA. Nous avons testé plusieurs concentrations pour le peptide contrôle, plusieurs volumes de réaction et en ajoutant ou non certains réactifs comme la chloroquine. Nos résultats montrent que lorsqu'on augmente la concentration en CPP et le volume de réaction, en présence de chloroquine, ce CPP contrôle est capable d'être internalisé dans les cellules (Figure 40).

C. Conclusion et perspectives

En ajustant la concentration en CPP provenant du cocktail et le volume de réaction, nous avons pu observer l'internalisation du peptide Atto488-BSA qui a lieu dans 90% des cellules COS7, validant ainsi cette approche. Ce résultat a également montré que nos premiers tests d'internalisation de protéines ne semblent pas induire une cytotoxicité sur ces cellules. Toutefois, la fonctionnalité des protéines que nous avons produites, reste encore à être évaluée.

En ce qui concerne les protéines Nter-His, NPH-His, Nter-TAT et NPH-TAT, nous avons réussi à produire ces protéines qu'en faible quantité, ce qui indique que le protocole de purification pour ces protéines recombinantes doit être amélioré. Une fois produites en grande quantité, nous pourrions tester la capacité d'internalisation de ces protéines et ainsi définir la meilleure approche.

CPP Atto488BSA

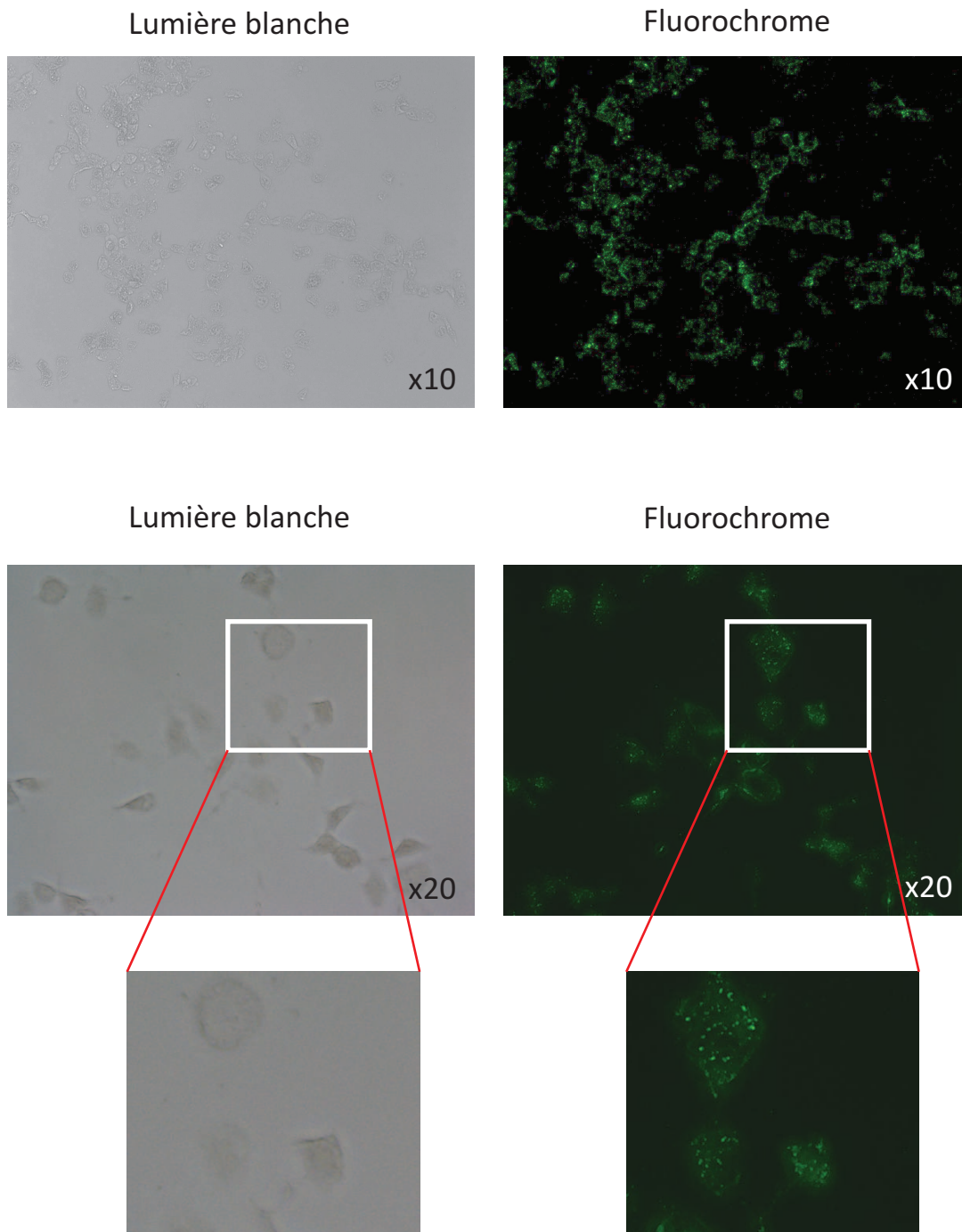


Figure 38 : Internalisation du peptide Atto488-BSA avec le cocktail de CPP

Cellules COS7 transduites avec le CPP contrôle Atto488-BSA (CPP observés en vert). Grossissement (x10 ou x20)

DISCUSSION

Les protéines adaptatrices jouent un rôle important dans la régulation du système hématopoïétique en contrôlant le développement des différents lignages hématopoïétiques qui en sont issus. Cette régulation se fait par modulation des complexes de signalisation, en affectant la stabilité ou la fonction des protéines qui les composent et leur adressage subcellulaire vers leurs cibles spécifiques. A présent, il est clair que le dérèglement de l'expression ou de la fonction des adaptateurs entraîne des conséquences pathologiques importantes. En effet, des altérations de fonctions d'adaptateurs négatifs ont été associées à des pathologies hématologiques, immunes et malignes. Ceci a été montré par des modèles animaux pour certains de ces adaptateurs et l'identification des mutations de ces protéines dans des pathologies humaines. A titre d'exemple, une déficience en SHP1, chez la souris, conduit à une hyperprolifération des cellules myéloïdes et à une inflammation chronique (phénotype « motheaten ») et des mutations de la E3 ligase Cbl ont été trouvées dans les pathologies myéloprolifératives, telles les NMP et les leucémies myélomonocytaire juvénile.

En ce qui concerne les protéines de la famille LNK, l'invalidation de leurs gènes chez la souris, a mis en évidence le rôle activateur de SH2-B et APS et/ou inhibiteur des protéines LNK et APS. De plus, leurs phénotypes murins reflètent des caractéristiques cliniques de pathologies humaines. Ainsi, l'invalidation de SH2-B chez la souris, induit une obésité morbide, retrouvée chez des patients mutés sur le gène de cette protéine (Doche et al., 2012).

Concernant LNK, les souris *Lnk*^{-/-} présentent une augmentation des lignages lymphocytaire B, érythrocytaire et mégacaryocytaire due à une hypersensibilité aux cytokines. En effet, un défaut de la fonction inhibitrice de LNK est impliqué, chez l'homme, dans le développement de NMP, mais aussi de LLA-B et de maladies inflammatoires et cardiovasculaires. Toutefois, l'expression de cette protéine dans des cellules de cancer ovarien, induit une prolifération des cellules tumorales.

L'ensemble de ces données montre que LNK peut donc avoir une fonction inhibitrice ou activatrice selon le système cellulaire dans lequel il est exprimé et les complexes de signalisation qu'il régule. De ce fait, l'étude des complexes de signalisation spécifique de LNK et de son mode de régulation, est centrale pour déterminer le rôle de l'adaptateur dans des contextes physiologiques et pathologiques. Ainsi, LNK pourrait potentiellement être utilisé comme outil ou cible thérapeutique selon la pathologie considérée.

Par conséquent, les objectifs de mon projet de thèse furent d'analyser structurellement et fonctionnellement, le complexe de signalisation LNK/JAK2 afin de comprendre le mécanisme d'action de l'adaptateur dans la signalisation JAK/STAT et l'implication de LNK dans le développement de ces pathologies. Aux vues de nos résultats, le deuxième objectif de ma thèse fut de développer une stratégie moléculaire afin d'utiliser LNK comme un inhibiteur spécifique de JAK2-V617F, chez les patients atteints de NMP.

I. Caractérisation structurale et fonctionnelle de LNK dans des contextes physiologiques et pathologiques

A. Caractérisation structurale de l'interaction LNK/JAK2

Dans ce contexte, l'un des principaux partenaires de LNK est la kinase JAK2. Des mutations de ces deux protéines ont été identifiées chez les patients atteints de NMP, mais aussi de LLA-B. Ceci suggère l'implication du complexe LNK/JAK2 dans le développement de ces hémopathies.

Des travaux réalisés par notre laboratoire et d'autres groupes ont confirmé que l'interaction entre LNK et JAK2 se fait majoritairement entre le domaine SH2 de LNK et, les résidus Y613 et Y813 phosphorylés des formes WT et mutée de JAK2 (JAK2-V617F). Ces résultats ont donc montré que la mutation V617F n'altère pas l'interaction entre ces résidus phosphorylés de la kinase et le domaine SH2 de LNK. Cependant, la présence de la mutation JAK2-V617F nous a surtout permis de mettre en évidence l'existence d'un nouveau site de liaison entre JAK2 et LNK qui se fait indépendamment du domaine SH2 de LNK. L'analyse de cette interaction a montré que la région N-terminale de LNK est capable de s'associer avec JAK2 sauvage et notamment avec la kinase non-phosphorylée. Toutefois, cette interaction est renforcée et stabilisée par la présence du domaine PH, probablement en facilitant la localisation membranaire de cette région. En effet, nos études sur l'interaction entre les formes tronquées de LNK et une forme inactive de JAK2, ont démontré que la région N-terminale sans ou avec le domaine PH (région NPH) de l'adaptateur s'associe avec la forme non-phosphorylée de JAK2.

Néanmoins, cette région NPH se lie préférentiellement à la kinase JAK2-V617F par rapport à JAK2-WT. Par ailleurs, nous avons observé que LNK-NPH interagit également avec la forme JAK2-K539L (mutation exon 12), retrouvée dans les NMP, avec la même intensité que JAK2-V617F. De plus, LNK-NPH se lie aussi à la forme JAK2-R683G (mutation exon 16), retrouvée notamment dans la LLA-B, de manière similaire qu'à JAK2-WT. Ces données indiquent que LNK régule ces formes de JAK2 différemment, ce qui laisse envisager son utilisation pour cibler spécifiquement certaines formes mutées de JAK2. Ce point sera expliqué plus en détail au cours de cette discussion.

De ce fait, l'ensemble de ces données nous ont permis de mettre en évidence pour la première fois, la fonction inhibitrice de la région NPH de LNK sur l'activité de JAK2. Ceci suggère que cette région de LNK intervient dans le maintien la kinase à l'état inactif, en l'absence de la stimulation des récepteurs par cytokine. De manière intéressante, un mécanisme similaire de fonctionnement a été montré pour les autres protéines de la famille LNK, SH2-B et APS. Ces adaptateurs se lient également au résidu Y813 phosphorylé de JAK2 activée, via leur domaine SH2, mais aussi à JAK2 non-phosphorylée, indépendamment du domaine SH2. Cette deuxième interaction avec JAK2 se fait via leur région N-terminale incluant le domaine PH et la séquence entre leurs domaines PH et SH2, permettant de maintenir JAK2 à l'état inactif, en

l'absence de cytokine (Kurzer et al., 2006 ; Rui et al., 2000). Ces données insinuent que la fonction régulatrice de la région N-terminale de ces adaptateurs est une caractéristique commune de cette famille.

Afin d'analyser l'interaction LNK/JAK2, au niveau de la kinase, nous avons développé une collaboration avec l'équipe du Dr. Silvennoinen spécialisée dans l'étude structurale et fonctionnelle de JAK2. Notre analyse préliminaire de l'interaction des différentes formes tronquées de JAK2 avec la région NPH de LNK, montre que LNK-NPH se lie préférentiellement aux domaines JH1 et FERM-SH2-like de JAK2 et avec une plus faible intensité au domaine JH2. D'après ces données et le modèle d'inhibition de JAK2 en *cis* proposé par l'équipe du Dr. Silvennoinen (Chapitre II, Figure 6), on peut envisager que le rapprochement entre le domaine JH1 et la région FERM-SH2-L de JAK2, facilite l'association de la région régulatrice NPH avec ces domaines, ce qui empêcherait l'activation de la kinase en renforçant l'interaction auto-inhibitrice JH1-JH2 (Figure 39).

La protéine régulatrice SOCS3 inhibe également l'activation de JAK2, par un mécanisme similaire. En effet, l'équipe de Varghese a montré que SOCS3 inhibe l'activation de JAK2, dans un modèle en *trans*, en se liant au domaine JH1 de la kinase et à un monomère du récepteur EPOR opposé à cette molécule de JAK2. Ainsi, cet adaptateur permet la stabilisation de l'interaction auto-inhibitrice JH1-JH2 entre les deux molécules de JAK2 (Varghese et al., 2014).

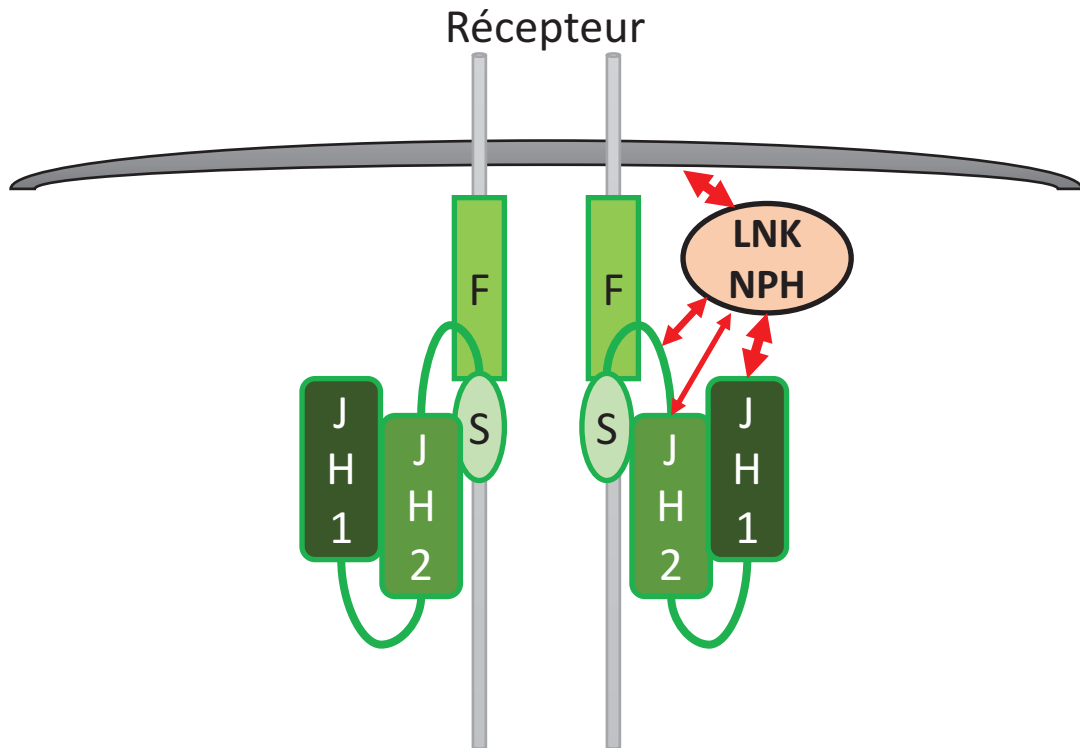


Figure 39 : Domaines de LNK et JAK2 impliqués dans leur interaction

LNK-NPH se lie à la membrane via son domaine PH et via la région N-terminale à la région FERM (F)/SH2-L (S) et plus faiblement avec le domaine JH2. Les intensités de ces liaisons sont représentées par l'épaisseur des flèches rouges.

B. Implication fonctionnelle de l'interaction LNK/JAK2

Comme décrit auparavant, nos études structurales suggèrent l'implication de la région NPH de LNK dans la régulation de JAK2. Dans ce contexte, il est important de remarquer que les mutations de LNK identifiées chez les patients atteints de NPM, se trouvent essentiellement dans cette région NPH. Ceci suggère l'implication de la région LNK-NPH dans le développement de ces pathologies. Afin de confirmer notre hypothèse, nous avons choisi d'étudier principalement deux mutations représentatives de cette région, la mutation LNK-G152R que nous avons identifiée dans la région N-terminale de l'adaptateur et la mutation LNK-E208Q, située dans le domaine PH de LNK. Notre analyse structurale de ces deux protéines mutées a montré qu'elles sont capables d'interagir avec les formes sauvage et mutée de JAK2 et d'être phosphorylées par ces kinases. Cependant, LNK-G152R semble se lie de manière plus importante à JAK2 que LNK-E208Q, dont l'interaction avec la kinase est équivalente à celle de LNK-WT. Ces résultats suggèrent donc une façon de réguler JAK2 différente entre ces deux mutations.

De ce fait, nous avons ensuite réalisé des études fonctionnelles sur les mutations LNK-G152R (LNK-GR) et LNK-E208Q (LNK-EQ) afin d'examiner leur rôle dans la pathogénèse des NMP. Nos essais de prolifération en colonie à partir de cellules dérivées de souris *Lnk*^{-/-} exprimant les mutations LNK-GR et EQ, ont montré que LNK-EQ abolit l'inhibition de la prolifération des progéniteurs mégacaryocytes, tandis que LNK-GR a un effet modéré sur l'inhibition de ces cellules. Cependant, la plupart des mutations de LNK sont retrouvées à l'état hétérozygote chez les patients NMP, nous avons donc analysé l'effet de ces mêmes mutations de LNK dans un contexte génétique hétérozygote en utilisant des cellules dérivées de souris *Lnk*^{+/-}. Dans ce contexte, LNK-EQ abolit de nouveau, la prolifération cellulaire, contrairement à LNK-GR qui se comporte comme une protéine WT. Ces résultats ont montré un effet dominant négatif de la mutation LNK-E208Q, ce qui confirme l'importance du domaine PH dans la fonction inhibitrice de l'adaptateur. Nos précédents travaux ont aussi notifié l'importance du domaine PH, lors de l'inhibition de JAK2 via le domaine SH2 de LNK.

Par ailleurs, la région N-terminale comprend le domaine de dimérisation, jouant un rôle important dans la fonction régulatrice de SH2B et APS. Dans cette optique, nos résultats ont également mis en évidence que la région N-terminale de LNK-WT est capable de s'homodimériser par son domaine de dimérisation, et que cette fonction n'est pas altérée par la présence des mutations G152R ou E208Q.

D'autre part, les mutations de LNK ne sont pas exclusives chez les patients atteints de NMP. Elles peuvent survenir chez des patients positifs pour JAK2-V617F. Dans ce contexte, nos essais de prolifération sur des cellules érythroblastiques exprimant JAK2-V617F (lignée HEL), ont montré que LNK-E208Q ne parvient plus à exercer sa fonction inhibitrice (Koren-Michowitz et al., 2013) (Jungalee, A et al, manuscrit en préparation), tandis que LNK-G152R a un effet inhibiteur modéré.

Sachant que la plupart des patients NMP ayant la mutation E208Q sont hétérozygotes, il est possible d'envisager qu'en présence de la forme oncogénique JAK2-V617F, la protéine LNK-EQ synergise alors avec JAK2 mutée, favorisant ainsi la prolifération anormale des cellules.

C. Rôle des mutations de LNK sur sa fonction régulatrice

Un des aspects plus intéressants dans l'étude de LNK est l'identification de mutations de cet adaptateur chez les patients atteints de trois hémopathies chroniques différentes, affectant des lignées hématopoïétiques distinctes. La plupart des mutations rapportées à ce jour, ont été identifiées dans les NMP où elles affectent principalement le lignage mégacaryocytaire. Dans ces pathologies, ces mutations peuvent elles-mêmes être à l'origine du phénotype NMP ou en synergie avec d'autres mutations et aboutir à une transformation leucémique (phénotype LMA). D'autre part, un grand pourcentage des mutations de LNK ont également été identifiées chez les patients atteints d'érythrocytose idiopathique (EI), capables d'affecter à elles seules, les cellules érythroïdes. Dans ce contexte, il est surprenant que la même mutation E208Q affecte deux pathologies différentes, les NMP et l'EI, une situation similaire à JAK2-V617F (impliquée dans trois pathologies différentes). Quant aux mutations de LNK identifiées chez les patients LLA-B, elles affectent notamment les précurseurs B, seules ou en présence d'autres mutations.

Les premières mutations de LNK ont été localisées principalement sur l'exon 2 codant pour le domaine PH de LNK. D'autres mutations ont été ensuite rapportées au niveau des autres domaines et régions de la protéine adaptatrice. Il est donc possible d'envisager que la position des mutations de LNK puisse donner des indications sur leurs effets et leurs conséquences pathologiques.

Les mutations de LNK situées dans la région N-terminale ont été retrouvées chez les patients TE et EI négatifs pour les mutations de JAK2. N'étant pas retrouvées chez les patients post-NMP ou LMA, elles ne semblent pas être impliquées dans la transformation leucémique de ces pathologies. De plus, ceci souligne l'importance de cette région dans la régulation des voies de signalisation stimulées par la TPO et l'EPO, respectivement dans les cellules mégacaryocytaires et érythrocytaires, comme l'ont confirmé nos essais de prolifération.

En ce qui concerne les mutations du domaine PH de LNK, elles sont les plus fréquentes, notamment chez les patients EI. Ces mutations peuvent entraîner une myélofibrose ou encore une LMA, en coopération ou non, avec d'autres mutations. D'après nos analyses structurales sur LNK-E208Q, la perte de la fonction inhibitrice de ce mutant est probablement due à un défaut de localisation à la membrane plasmique du mutant LNK-E208Q (Figure 41). En effet, notre modélisation du domaine PH de LNK comportant la mutation E208Q montre que ce résidu est situé dans le motif de liaison aux phosphoinositides de la membrane plasmique. Ces données pourraient en partie expliquer le phénotype des patients atteints de NMP ayant la mutation LNK-E208Q. En théorie, les autres mutations de ce domaine se trouvant à proximité de LNK-E208Q, pourraient déstabiliser l'interaction entre l'adaptateur et les phosphoinositides

de la membrane et ainsi, affecter la fonction inhibitrice de la protéine par une localisation inappropriée.

Quant aux mutations du domaine SH2 et de la région C-terminale de LNK, elles sont peu nombreuses et retrouvées chez des patients atteints de NPM positifs pour JAK2-V617F, mais également post-NMP. Ici, on retrouve aussi la plupart des délétions et insertions identifiées dans les NMP négatives pour JAK2-V617F. Ceci pourrait être expliqué par leur caractère délétère, générant des protéines instables et rapidement éliminées.

Dans le cas des patients LLA-B, la mutation de leur gène *LNK*, entraîne une perte d'expression de la protéine, causée par un décalage du cadre de lecture. Ceci qui pourrait être à l'origine du phénotype LLA.

Cependant, pour la plupart de patients ayant des mutations de *LNK*, seul l'état mutationnel par rapport à *JAK2* est connu. Il serait donc intéressant de savoir si les patients ayant des mutations de *LNK* présentent également des mutations dans *MPL* ou *CALR* et analyser leurs implications pathologiques.

D. Modèle d'inhibition de LNK

Ainsi, l'ensemble de nos données ont indiqué que le domaine PH, en synergie avec la région N-terminale de LNK, participe au maintien de JAK2 inactif à l'état basal et en synergie avec le domaine SH2 de LNK, contribue à l'inhibition de l'activation de la kinase. Toutefois, le mécanisme par lequel LNK régule JAK2, dans un contexte physiologique et la manière dont les mutations altèrent la fonction inhibitrice de LNK, n'est pas clairement identifiée.

1. Modèle d'action de LNK -WT

De ce fait, mes résultats permettent de proposer un modèle d'inhibition de LNK dans un contexte physiologique. En prenant comme modèle la voie de signalisation de la TPO, nous proposons que la région NPH de LNK se lie à chaque molécule de JAK2 à l'état basal, afin de maintenir la kinase à l'état inactif. Ceci facilite l'homodimérisation des deux molécules de LNK via leur domaine de dimérisation, tout en étant lié aux régions JH1 de JAK2. La présence de LNK-NPH renforcerait d'une part l'inhibition intra-JAK2 via JH1-JH2 et d'autre part, elle préviendrait l'activation inappropriée de la kinase (Figure 40A). Lors de la stimulation du récepteur MPL, JAK2 va induire son autophosphorylation et la phosphorylation de LNK. Ceci mènera à la phosphorylation des résidus sérine de la région N-terminale de LNK par les protéines GSK3 et PKA, permettant sa liaison avec 14.3.3. Cette interaction va ensuite, abolir l'interaction entre LNK et JAK2 par séquestration de LNK dans le cytoplasme, permettant ainsi la transduction du signal (Figure 40B). Par un mécanisme indéterminé à notre connaissance, 14.3.3 va libérer LNK et permettre cette fois-ci l'interaction via le domaine SH2 de LNK et les résidus Y613/813 phosphorylés de JAK2 afin d'inhiber la transduction du signal. Dans ce

modèle, LNK peut ainsi bloquer directement l'activation de JAK2 ou en masquer les sites d'interaction pour d'autres protéines.

Cependant, on peut également envisager l'action inhibitrice indirecte de LNK par son interaction avec une autre protéine modulatrice, tel que Cbl, ce qui mènerait à la dégradation du récepteur ou des protéines de signalisation en aval. En effet, nous avons montré dans des cellules B que LNK est capable d'interagir avec Cbl (Dondi et collaborateurs, manuscrit en préparation), ce qui pourrait théoriquement faciliter l'inhibition du signal via la dégradation du complexe de signalisation par la E3 ligase. En effet, un mécanisme similaire a été démontré lorsque Cbl interagit avec APS lié au récepteur à l'insuline, cela permet la dégradation du récepteur (Kishi et al., 2007). Dans ce cas, APS joue seulement un rôle d'adaptateur pour Cbl, ce qui pourrait aussi être le cas de LNK. Dans les deux cas, la liaison entre l'adaptateur (LNK ou APS) et Cbl conduit à l'inhibition de la transduction du signal (Figure 40C).

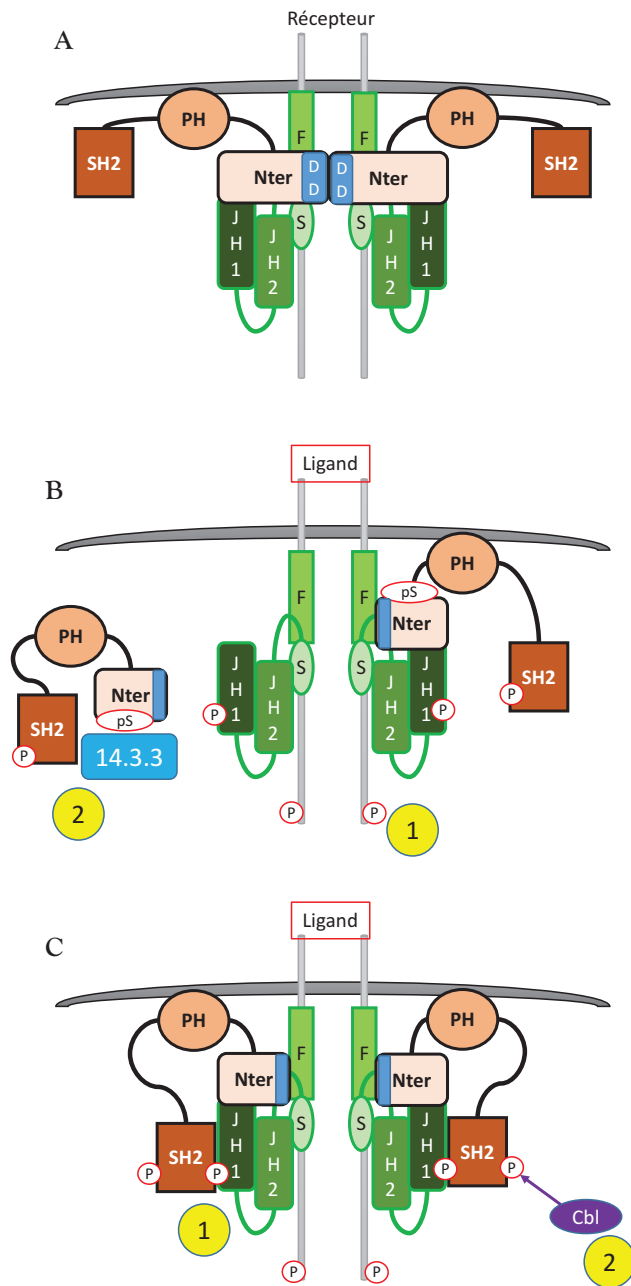


Figure 40 : Modèle d'inhibition de LNK WT dans la voie TPO

A) A l'état basal, les molécules de LNK (représenté par ses trois domaines, incluant le domaine de dimérisation (DD) ; protéine en dégradé marron) se lie à chaque JAK2 (FERM (F) ; SH2-like (S) ; JH2 et JH1 ; protéine en dégradé vert) et s'homodimérise via leur domaine de dimérisation. B) Lors de la stimulation du récepteur par la TPO, les kinases JAK2 s'autophosphorylent, entraînant la phosphorylation du récepteur et des molécules en aval dont LNK ; résidus tyrosine (P) et sérine (pS) phosphorylés (1). Ceci permet l'interaction de LNK avec 14.3.3, qui abolit l'interaction entre LNK et JAK2, permettant ainsi la transduction du signal (2). C) Puis 14.3.3 libère LNK qui va se fixer via son domaine SH2 à JAK2 afin d'inhiber la transduction du signal (1). L'inhibition de cette signalisation peut se faire également par la fixation de Cbl (2).

2. Modèle d'action des mutations de LNK

Les patients atteints de NMP étant hétérozygotes pour les mutations de LNK, nous avons représenté sur nos modèles une protéine LNK-WT et une protéine mutée, liées aux kinases JAK2-WT. Comme expliqué précédemment, la perte de la fonction inhibitrice de LNK-E208Q est probablement due à un défaut de localisation à la membrane plasmique de cette protéine. En effet, notre étude sur la localisation cellulaire des protéines mutées montre que LNK-E208Q est plus localisée dans le cytoplasme qu'à la membrane plasmique, alors que LNK-G152R semble être plus présente à la membrane. Ainsi, nous avons imaginé un modèle où une protéine LNK-E208Q dimérise avec une protéine LNK-WT. Cette dimérisation pourrait être altérée par la quantité de la protéine mutée présente au sein du complexe de signalisation, ce qui empêcherait l'inhibition de JAK2 à l'état basal (Figure 41A). Lorsque le récepteur est stimulé par son ligand permettant l'activation de JAK2 et la phosphorylation de LNK, ce dernier se lie à JAK2 via son domaine SH2. Cependant, une mauvaise conformation ou localisation de la protéine dans de le complexe du fait de la mutation EQ, abolit la fonction inhibitrice de l'adaptateur. La mutation de LNK pourrait aussi rendre plus forte son interaction avec la protéine 14.3.3, entraînant une rétention de LNK dans le cytoplasme (Figure 41B-C).

Quant au mutant LNK-G152R, la localisation de cette mutation dans la région N-terminale de l'adaptateur semble être à l'origine d'une interaction plus importante avec JAK2-V617F et entraîner une phosphorylation plus importante de l'adaptateur. Néanmoins, elle pourrait altérer la dimérisation des deux protéines de LNK, ayant comme conséquence, une diminution de l'inhibition de JAK2 à l'état basal (Figure 42A). D'autre part, comme mentionné auparavant, la protéine 14.3.3 participe à la régulation de la voie de signalisation induite par la TPO en s'associant aux résidus serine phosphorylés S129 chez la souris (S150 chez l'homme) dans la région N-terminale de LNK. La mutation G152R étant proche de cette sérine, elle pourrait provoquer un changement de conformation de la protéine, ainsi permettre une interaction plus importante avec 14.3.3. Le résultat serait l'activation de la kinase à l'état basal mais aussi après stimulation du récepteur. De plus, ce mutant étant phosphorylé de manière plus importante par JAK2-V617F, il pourrait être plus facilement ciblé par d'autre protéine de régulation telle que Cbl (Figure 42 B-C).

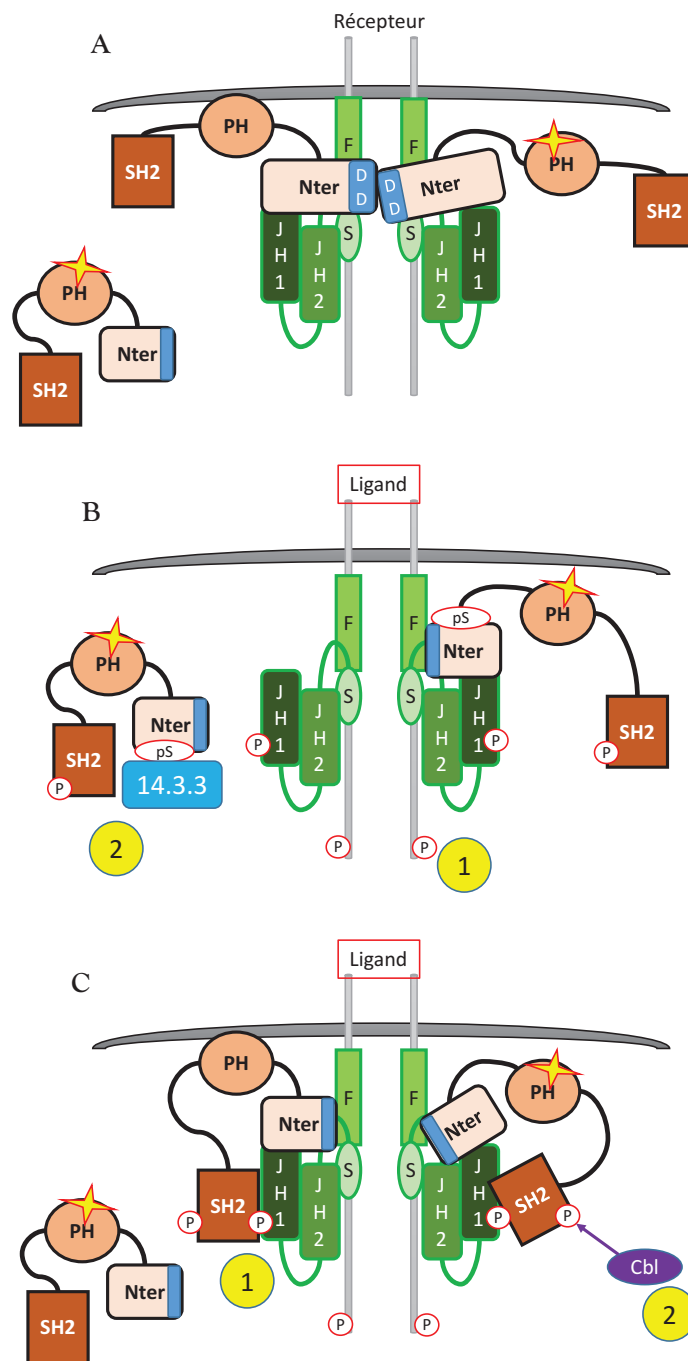


Figure 41 : Modèle d'action de LNK-E208Q

A) A l'état basal, les molécules de LNK (molécule en dégradé marron ; l'étoile jaune représente la mutation LNK-E208Q) se lie à chaque JAK2 (FERM (F) ; SH2-like (S) ; JH2 et JH1 ; protéine en dégradé vert) et s'homodimérise via leur domaine de dimérisation (DD). B) Lors de la stimulation du récepteur par une cytokine, les kinases JAK2 s'autophosphorylent, entraînant la phosphorylation du récepteur et des molécules en aval dont LNK ; résidus tyrosine (P) et sérine (pS) phosphorylés (1). Ceci permet l'interaction de LNK avec 14.3.3, qui abolit l'interaction entre LNK et JAK2 (2). C) Puis 14.3.3 libère LNK qui va se fixer via son domaine SH2 à JAK2 (1). La fixation de Cbl à LNK pourrait induire la dégradation de protéine de signalisation ou LNK lui-même (2).

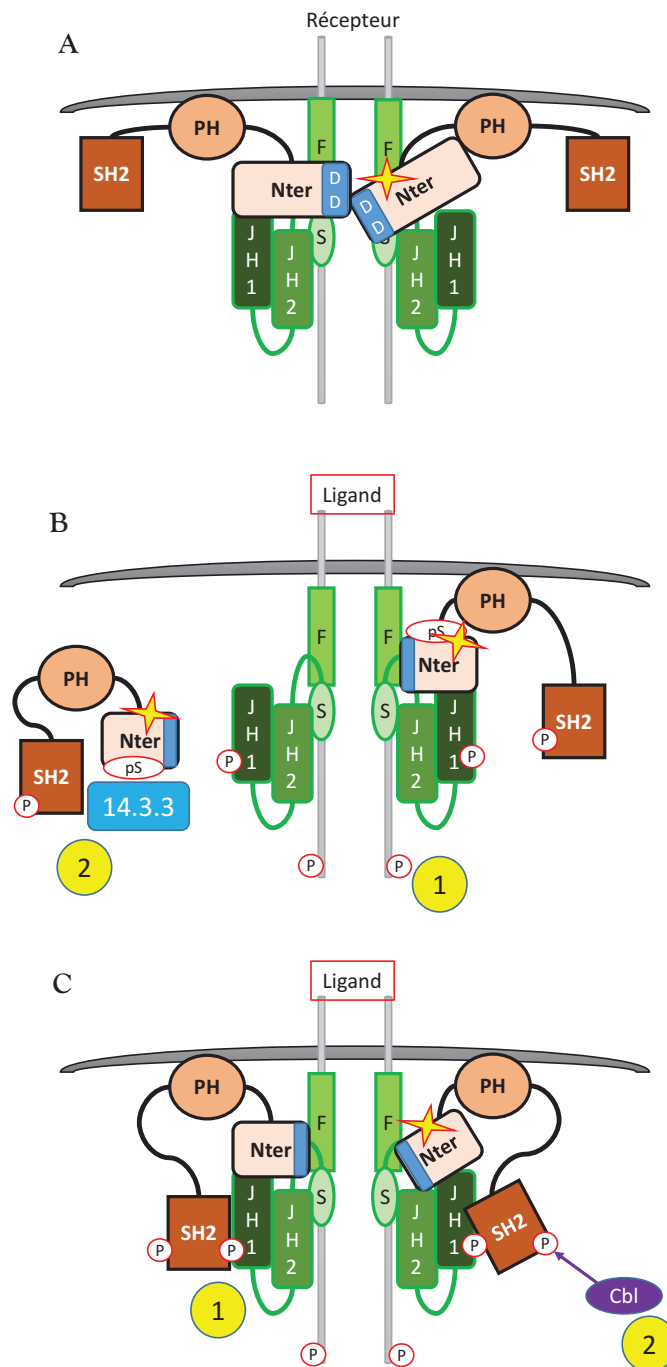


Figure 42 : Modèle d'action de LNK-G152R

A) A l'état basal, les molécules de LNK (molécule en dégradé marron ; l'étoile jaune représente la mutation LNK-G152R) se lie à chaque JAK2 (FERM (F) ; SH2-like (S) ; JH2 et JH1 ; protéine en dégradé vert) et s'homodimérise via leur domaine de dimérisation (DD). B) Lors de la stimulation du récepteur par une cytokine, les kinases JAK2 s'autophosphorylent, entraînant la phosphorylation du récepteur et des molécules en aval dont LNK ; résidus tyrosine (P) et sérine (pS) phosphorylés (1). Ceci permet l'interaction de LNK avec 14.3.3, qui abolit l'interaction entre LNK et JAK2 (2). C) Puis 14.3.3 libère LNK qui va se fixer via son domaine SH2 à JAK2 (1). La fixation de Cbl à LNK pourrait induire la dégradation de protéine de signalisation ou LNK lui-même (2).

II. Utilisation de LNK comme outil thérapeutique

Dans nos précédents travaux, nous avons observé que le niveau d'expression élevé de LNK corrèle avec un seuil d'activation faible de JAK2-V617F chez les patients NMP comparé à sa forme sauvage, JAK2-WT. Toutefois, LNK semble incapable d'inhiber la prolifération des cellules de patients contrairement aux résultats que nous avons obtenus avec nos lignées cellulaires ou cellules primaires de souris. Ceci pourrait être expliqué par le niveau d'expression de ces deux protéines chez les patients par rapport à nos cellules expérimentales. Ainsi, le taux d'expression de l'adaptateur dans les cellules détermine le degré d'inhibition de JAK2V617F.

Comme décrit dans le chapitre 5, les inhibiteurs de JAK de type I entraîneraient des résistances à long terme. Ceci expliquerait le développement des inhibiteurs de type II, dont le rôle est de stabiliser la forme inactive de JAK2. Ce qui pourrait s'avérer plus effectif dans l'amélioration de la qualité de vie des patients atteints de NMP. Dans ce sens, nos résultats sur la région NPH de LNK indiquent qu'elle régule négativement JAK2, à l'état basal. Cette caractéristique inhibitrice de LNK-NPH pourrait donc être exploitée pour bloquer JAK2 dans sa conformation inactive comme les inhibiteurs du type II.

De plus, la région NPH de LNK se lie de manière plus importante à JAK2-V617F qu'à JAK2-WT. Sur la base du modèle de l'équipe de Silvennoinen, il est possible que la conformation modifiée de JAK2-V617F soit plus favorable à l'interaction avec la région NPH, car JAK2-V617F présente une conformation partielle, libérant JH1 de son interaction avec JH1. La région NPH de LNK se liant préférentiellement à JH1, cette conformation protéique favoriserait leur interaction. Ces données suggèrent que la région NPH de LNK pourrait être utilisée comme inhibiteur spécifique de JAK2-V617F, dans le même but que les inhibiteurs de type II de JAK.

De ce fait, notre deuxième axe de recherche fut consacré au développement d'une stratégie moléculaire afin d'utiliser la fonction négative de la région NPH de LNK pour cibler de manière spécifique JAK2-V617F.

Nous avons donc choisi de créer des peptides pénétrants capables de transporter la région régulatrice NPH de LNK dans les cellules hématopoïétiques. A notre connaissance, une seule étude a été réalisée en utilisant le CPP polyarginine couplé à la protéine entière de LNK pour inhiber la prolifération de cellules. Ainsi, l'équipe de Looi a montré que ce CPP-LNK possède la capacité d'inhiber la prolifération de cellules mégacaryoblastiques (Looi et al., 2011), cependant, aucun test de cytotoxicité n'a été réalisé. Dans cette même étude, la forme entière de LNK est introduite dans les cellules, or l'utilisation d'un peptide pénétrant long entraîne un risque de cytotoxicité élevée. De plus, le choix d'utiliser un CPP poly-arginine plutôt qu'un CPP-TAT, est expliqué par sa capacité d'internalisation plus élevée. Toutefois, l'évaluation de la cytotoxicité de ces peptides, à une même concentration, montre que les CPP-TAT sont moins toxiques que les CPP-poly-arginine (Jones et al., 2005).

Puisque l'objectif à long terme de notre approche est de traiter des patients atteints de NMP, la toxicité de cette méthode doit être très faible. Ainsi, l'utilisation de la région NPH seule et des CPP-TAT pour le développement de ces approches semble être idéale. L'avantage d'utiliser les CPP-TAT est, qu'ils sont liés de manière covalente à son cargo. De ce fait, la probabilité de perdre notre protéine NPH avant qu'elle atteigne sa cible (JAK2) serait réduite. Par contre, cet avantage peut être aussi un inconvénient. Le CPP-TAT étant fusionné au cargo, il pourrait par sa présence, empêcher le cargo de se lier à sa cible. Nous avons donc choisi de développer une deuxième approche qui consiste à lier de manière non-covalente, notre région d'intérêt à un cocktail de CPP commercial. L'un des avantages de cette méthode est que lorsque le cargo est mis en présence du cocktail, il peut se lier à plusieurs CPP. Ceci augmenterait la compatibilité avec plusieurs types cellulaires, mais aussi permettrait l'utilisation de différentes voies d'internalisation, donc la probabilité d'être dégradé serait plus faible. En revanche, plusieurs paramètres doivent être pris en considération afin d'utiliser cette approche, d'autant plus qu'elle n'est pas spécifique à un type cellulaire. La comparaison de ces deux approches est nécessaire afin d'évaluer le CPP qui est le moins toxique avec la meilleure capacité d'internalisation et le plus efficace concernant la délivrance du cargo.

L'utilisation de la région NPH dans cette approche, plutôt que la région N-terminale seule diminuerait la toxicité qui est un choix technique stratégique. En effet, l'interaction entre la région N-terminale de LNK et JAK2 est renforcée et stabilisée par la présence du domaine PH et ceci est due à la spécificité d'interaction du domaine PH aux phosphoinositides de la membrane plasmique. De ce fait, le CPP-NPH peut, grâce au domaine PH, être localisé au complexe de signalisation où se trouve JAK2. Une fois la région NPH de LNK serait proche de la kinase, elle pourrait se lier à JH1 et FERM-SH2-L, réussir à changer la conformation de la kinase VF et ainsi maintenir la kinase dans une conformation inactive (Figure 43).

Cependant, le problème principal de l'utilisation des CPP repose sur leur non spécificité à un type cellulaire. Il faut donc développer un CPP spécifique aux HSC puisque les NMP sont des pathologies clonales des HSC

Les progéniteurs hématopoïétiques présentent à leur surface la glycoprotéine CD34 qu'ils perdent au cours de leur différenciation. Cet antigène est impliqué dans la localisation et l'adhérence des progéniteurs dans la moelle osseuse. De ce fait, le développement d'une stratégie permettant de fusionner au CPP une séquence de domiciliation dérivée du CD34 serait une éventuelle solution afin de traiter les progéniteurs hématopoïétiques exprimant JAK2-V617F.

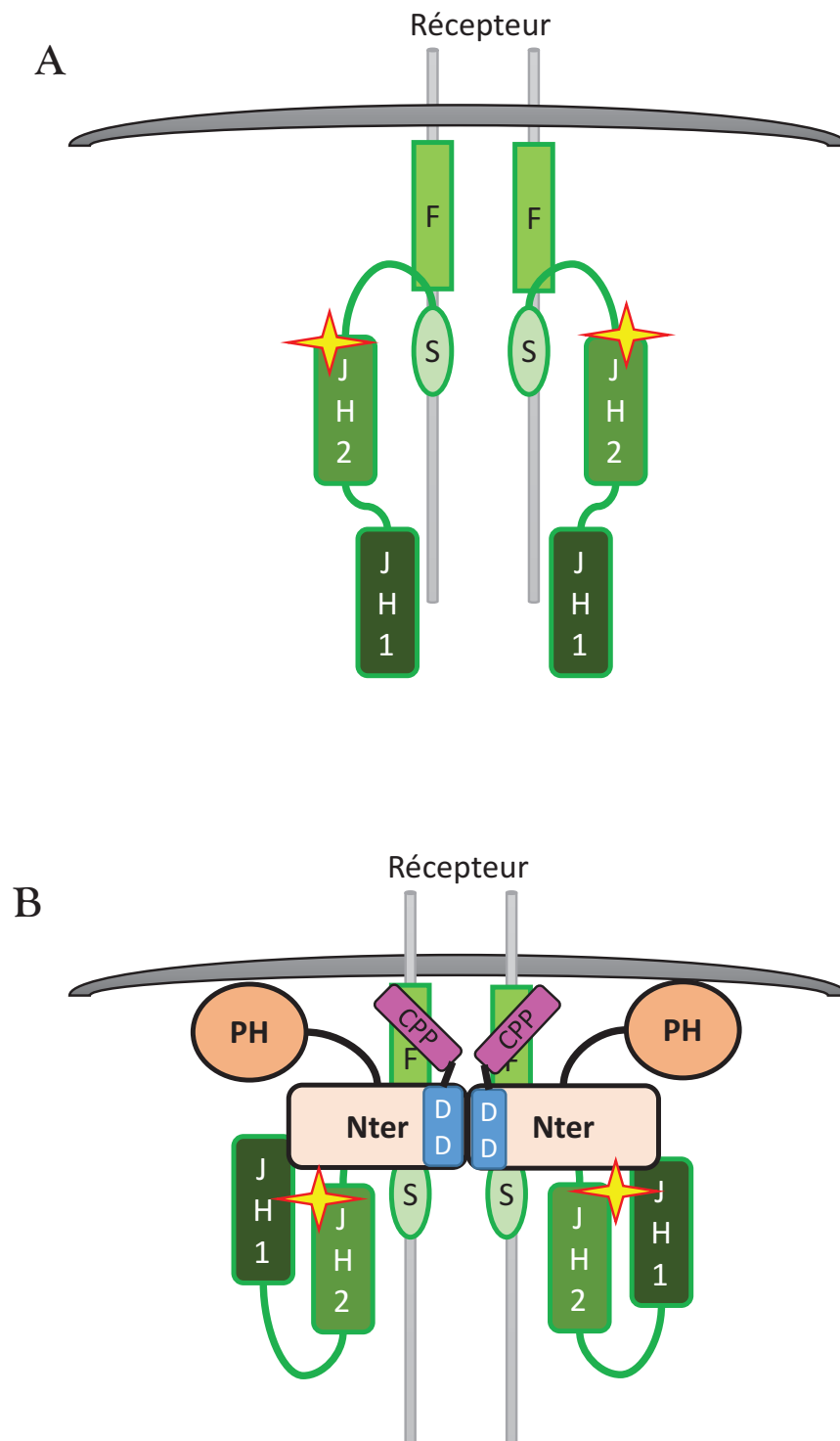


Figure 43 : Modèle d'action d'un CPP-LNK-NPH

A) Conformation de JAK2-V617F, où JH1 n'est pas lié à JH2 d'après Silvennoinen (mutation : étoile jaune). B) les domaines NPH de LNK se lie aux domaines JH1 et la liaison FERM-SH2-L de JAK2. Puis les régions NPH s'homodimérise, permettant ainsi le rapprochement entre JH1 et JH2.

III. Perspectives

Pour les patients NMP ayant notamment une dérégulation des lignées myéloïdes, il est important de comprendre les voies de signalisation impliquées dans la régulation de ces cellules afin de trouver un traitement adéquat.

Nos connaissances actuelles sur le rôle de la famille LNK dans la régulation des voies de signalisation de la TPO et de l'EPO montrent la spécificité et la redondance fonctionnelle des adaptateurs de cette famille. En ce qui concerne les voies de signalisation stimulées par la TPO, LNK est le seul membre de cette famille à être impliqué dans cette voie, où elle régule négativement les voies JAK/STAT, Ras/MAPK et PI3K/AKT en se liant à la kinase JAK2 mais également au récepteur MPL. Ceci suggère la capacité de LNK à exercer sa fonction inhibitrice en ciblant différentes molécules du complexe de signalisation, de la même manière que les adaptateurs de la famille SOCS. En revanche, les voies de signalisation stimulées par l'EPO peuvent, quant à elles, être régulées par les trois membres de la famille LNK. Dans ce contexte, LNK et APS se lient à JAK2 afin d'inhiber les voies de signalisation en aval, tandis que SH2-B les inhibe en se liant directement au récepteur à l'EPO. Cependant, à ce jour, il n'y a pas d'évidences *in vivo* montrant la capacité des autres deux membres de la famille à réguler la signalisation EPO, comme montré pour LNK.

Notre étude, sur l'interaction LNK/JAK2 et sur les mutations de LNK dans les NMP, ont permis de mieux comprendre le mécanisme de régulation de LNK sur JAK2. En effet, la région NPH de LNK a une fonction inhibitrice, exploitable dans le développement de traitements pour les patients atteints de NMP positifs pour JAK2-V617F. Cet adaptateur pourrait aussi être une cible thérapeutique dans le traitement de d'autres pathologies, telles que les LLA-B, les maladies inflammatoires et cardiaques dans lesquelles des mutations de LNK sont impliquées.

D'autre part, il est clair que la fonction de LNK dépend donc du type cellulaire dans lequel il est exprimé. Ainsi, dans les cancers solides, comme le cancer ovarien, LNK joue un rôle important en tant qu'activateur des voies de signalisation. Dans ce contexte pathologique, il serait plus intéressant de cibler LNK afin d'inhiber son expression et ainsi que la prolifération de cellules tumorales.

Nos données ont aussi apporté des connaissances sur les effets des mutations de LNK dans le développement des NMP. D'après nos résultats, les effets de ces mutations agissent en synergie avec ceux de JAK2-V617F et sûrement avec d'autres mutations dans ces pathologies, ce qui souligne son importance dans ces maladies. Cela nous a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces mutants et d'émettre des hypothèses sur le mécanisme d'action des autres mutations présentes dans l'adaptateur LNK.

Ainsi, grâce à nos approches, à la fois fondamentale et appliquée, l'ensemble de mes travaux permet d'envisager le développement d'une stratégie moléculaire utilisant la région régulatrice NPH de LNK afin d'inhiber la prolifération de cellules de patients dépendante de JAK2-V617F,

dans les NMP, et éventuellement dans d'autres hémopathies positives pour JAK2 mutée, telles les LLA-B.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmed, Z., Smith, B. J., Kotani, K., Wilden, P., and Pillay, T. S. (1999). APS, an adapter protein with a PH and SH2 domain, is a substrate for the insulin receptor kinase. *Biochem J* 341 (Pt 3), 665-668.
- Akada, H., Akada, S., Hutchison, R. E., Sakamoto, K., Wagner, K. U., and Mohi, G. (2014). Critical role of Jak2 in the maintenance and function of adult hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 32, 1878-1889.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I. L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.
- Alcina, A., Vandebroek, K., Otaegui, D., Saiz, A., Gonzalez, J. R., Fernandez, O., Cavanillas, M. L., Cenit, M. C., Arroyo, R., Alloza, I., *et al.* (2010). The autoimmune disease-associated KIF5A, CD226 and SH2B3 gene variants confer susceptibility for multiple sclerosis. *Genes Immun* 11, 439-445.
- Babon, J. J., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Nicola, N. A., and Varghese, L. N. (2014). The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochem J* 462, 1-13.
- Baker, S. J., Rane, S. G., and Reddy, E. P. (2007). Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26, 6724-6737.
- Baran-Marszak, F., Magdoud, H., Desterke, C., Alvarado, A., Roger, C., Harel, S., Mazoyer, E., Cassinat, B., Chevret, S., Tonetti, C., *et al.* (2010). Expression level and differential JAK2-V617F-binding of the adaptor protein Lnk regulates JAK2-mediated signals in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 116, 5961-5971.
- Barres, R., Gonzalez, T., Le Marchand-Brustel, Y., and Tanti, J. F. (2005). The interaction between the adaptor protein APS and Enigma is involved in actin organisation. *Exp Cell Res* 308, 334-344.
- Baxter, E. J., Scott, L. M., Campbell, P. J., East, C., Fourouclas, N., Swanton, S., Vassiliou, G. S., Bench, A. J., Boyd, E. M., Curtin, N., *et al.* (2005).

Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365, 1054-1061.

- Bechara, C., and Sagan, S. (2013). Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand? *FEBS Lett* 587, 1693-1702.
- Bennett, M., and Stroncek, D. F. (2006). Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *J Transl Med* 4, 41.
- Bernards, A. (1991). Predicted tyk2 protein contains two tandem protein kinase domains. *Oncogene* 6, 1185-1187.
- Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., Jing, J., Kundu, M., Blobel, G. A., Chikwava, K. R., and Tong, W. (2010). Lnk constrains myeloproliferative diseases in mice. *J Clin Invest* 120, 2058-2069.
- Bersenev, A., Wu, C., Balcerek, J., and Tong, W. (2008). Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J Clin Invest* 118, 2832-2844.
- Blass, G., Mattson, D. L., and Staruschenko, A. (2016). The function of SH2B3 (LNK) in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 311, F682-F685.
- Blom, B., and Spits, H. (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol* 24, 287-320.
- Brown, G., Mooney, C. J., Alberti-Servera, L., Muenchow, L., Toellner, K. M., Ceredig, R., and Rolink, A. (2015). Versatility of stem and progenitor cells and the instructive actions of cytokines on hematopoiesis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 52, 168-179.
- Buza-Vidas, N., Antonchuk, J., Qian, H., Mansson, R., Luc, S., Zandi, S., Anderson, K., Takaki, S., Nygren, J. M., Jensen, C. T., and Jacobsen, S. E. (2006). Cytokines regulate postnatal hematopoietic stem cell expansion: opposing roles of thrombopoietin and LNK. *Genes Dev* 20, 2018-2023.
- Campbell, P. J., and Green, A. R. (2006). The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 355, 2452-2466.
- Cardozo, A. K., Buchillier, V., Mathieu, M., Chen, J., Ortis, F., Ladriere, L., Allaman-Pillet, N., Poirot, O., Kellenberger, S., Beckmann, J. S., *et al.* (2007). Cell-permeable peptides induce dose- and length-dependent cytotoxic effects. *Biochim Biophys Acta* 1768, 2222-2234.

- Cazzola, M., and Kralovics, R. (2014). From Janus kinase 2 to calreticulin: the clinically relevant genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123, 3714-3719.
- Chachoua, I., Pecquet, C., El-Khoury, M., Nivarthi, H., Albu, R. I., Marty, C., Gryshkova, V., Defour, J. P., Vertenoil, G., Ngo, A., *et al.* (2016). Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* 127, 1325-1335.
- Chen, L., and Carter-Su, C. (2004). Adapter protein SH2-B beta undergoes nucleocytoplasmic shuttling: implications for nerve growth factor induction of neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 24, 3633-3647.
- Chen, Y., Fang, F., Hu, Y., Liu, Q., Bu, D., Tan, M., Wu, L., and Zhu, P. (2016). The Polymorphisms in LNK Gene Correlated to the Clinical Type of Myeloproliferative Neoplasms. *PLoS One* 11, e0154183.
- Cheng, Y., Chikwava, K., Wu, C., Zhang, H., Bhagat, A., Pei, D., Choi, J. K., and Tong, W. (2016). LNK/SH2B3 regulates IL-7 receptor signaling in normal and malignant B-progenitors. *J Clin Invest* 126, 1267-1281.
- Choong, M. L., Pecquet, C., Pendharkar, V., Diaconu, C. C., Yong, J. W., Tai, S. J., Wang, S. F., Defour, J. P., Sangthongpitag, K., Villeval, J. L., *et al.* (2013). Combination treatment for myeloproliferative neoplasms using JAK and pan-class I PI3K inhibitors. *J Cell Mol Med* 17, 1397-1409.
- Cleary, C., and Kralovics, R. (2013). Molecular basis and clonal evolution of myeloproliferative neoplasms. *Clin Chem Lab Med* 51, 1889-1896.
- Crocker, B. A., Kiu, H., and Nicholson, S. E. (2008). SOCS regulation of the JAK/STAT signalling pathway. *Semin Cell Dev Biol* 19, 414-422.
- Dale, B. L., and Madhur, M. S. (2016). Linking inflammation and hypertension via LNK/SH2B3. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 25, 87-93.
- Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 6, 372-375.
- Dawson, M. A., Bannister, A. J., Gottgens, B., Foster, S. D., Bartke, T., Green, A. R., and Kouzarides, T. (2009). JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature* 461, 819-822.
- de Graaf, C. A., and Metcalf, D. (2011). Thrombopoietin and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle* 10, 1582-1589.

- Desterke, C., Martinaud, C., Ruzehaji, N., and Le Bousse-Kerdiles, M. C. (2015). Inflammation as a Keystone of Bone Marrow Stroma Alterations in Primary Myelofibrosis. *Mediators Inflamm* 2015, 415024.
- Devalliere, J., Chatelais, M., Fitau, J., Gerard, N., Hulin, P., Velazquez, L., Turner, C. E., and Charreau, B. (2012). LNK (SH2B3) is a key regulator of integrin signaling in endothelial cells and targets alpha-parvin to control cell adhesion and migration. *FASEB J* 26, 2592-2606.
- Dhe-Paganon, S., Werner, E. D., Nishi, M., Hansen, L., Chi, Y. I., and Shoelson, S. E. (2004). A phenylalanine zipper mediates APS dimerization. *Nat Struct Mol Biol* 11, 968-974.
- Diakonova, M., Gunter, D. R., Herrington, J., and Carter-Su, C. (2002). SH2-Bbeta is a Rac-binding protein that regulates cell motility. *J Biol Chem* 277, 10669-10677.
- Ding, J., Komatsu, H., Wakita, A., Kato-Uranishi, M., Ito, M., Satoh, A., Tsuboi, K., Nitta, M., Miyazaki, H., Iida, S., and Ueda, R. (2004). Familial essential thrombocythemia associated with a dominant-positive activating mutation of the c-MPL gene, which encodes for the receptor for thrombopoietin. *Blood* 103, 4198-4200.
- Ding, L. W., Sun, Q. Y., Lin, D. C., Chien, W., Hattori, N., Dong, X. M., Gery, S., Garg, M., Doan, N. B., Said, J. W., *et al.* (2015). LNK (SH2B3): paradoxical effects in ovarian cancer. *Oncogene* 34, 1463-1474.
- Doche, M. E., Bochukova, E. G., Su, H. W., Pearce, L. R., Keogh, J. M., Henning, E., Cline, J. M., Saeed, S., Dale, A., Cheetham, T., *et al.* (2012). Human SH2B1 mutations are associated with maladaptive behaviors and obesity. *J Clin Invest* 122, 4732-4736.
- Dorritie, K. A., McCubrey, J. A., and Johnson, D. E. (2014). STAT transcription factors in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia* 28, 248-257.
- Duan, C., Yang, H., White, M. F., and Rui, L. (2004). Disruption of the SH2-B gene causes age-dependent insulin resistance and glucose intolerance. *Mol Cell Biol* 24, 7435-7443.
- Dusa, A., Mouton, C., Pecquet, C., Herman, M., and Constantinescu, S. N. (2010). JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors. *PLoS One* 5, e11157.

- Eggert, A., Ikegaki, N., Liu, X., Chou, T. T., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Brodeur, G. M. (2000). Molecular dissection of TrkA signal transduction pathways mediating differentiation in human neuroblastoma cells. *Oncogene* 19, 2043-2051.
- Ema, H., Sudo, K., Seita, J., Matsubara, A., Morita, Y., Osawa, M., Takatsu, K., Takaki, S., and Nakauchi, H. (2005). Quantification of self-renewal capacity in single hematopoietic stem cells from normal and Lnk-deficient mice. *Dev Cell* 8, 907-914.
- Farkhani, S. M., Valizadeh, A., Karami, H., Mohammadi, S., Sohrabi, N., and Badrzadeh, F. (2014). Cell penetrating peptides: efficient vectors for delivery of nanoparticles, nanocarriers, therapeutic and diagnostic molecules. *Peptides* 57, 78-94.
- Fiedler, K. (2012). *Hematology - Science and Practice, Mechanisms Controlling Hematopoiesis*.
- Fitau, J., Boulday, G., Coulon, F., Quillard, T., and Charreau, B. (2006). The adaptor molecule Lnk negatively regulates tumor necrosis factor- α -dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and -2 pathways. *J Biol Chem* 281, 20148-20159.
- Flister, M. J., Hoffman, M. J., Lemke, A., Prisco, S. Z., Rudemiller, N., O'Meara, C. C., Tsaih, S. W., Moreno, C., Geurts, A. M., Lazar, J., *et al.* (2015). SH2B3 Is a Genetic Determinant of Cardiac Inflammation and Fibrosis. *Circ Cardiovasc Genet* 8, 294-304.
- Funakoshi-Tago, M., Tago, K., Abe, M., Sonoda, Y., and Kasahara, T. (2010). STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *J Biol Chem* 285, 5296-5307.
- Gery, S., Cao, Q., Gueller, S., Xing, H., Tefferi, A., and Koeffler, H. P. (2009a). Lnk inhibits myeloproliferative disorder-associated JAK2 mutant, JAK2V617F. *J Leukoc Biol* 85, 957-965.
- Gery, S., Gueller, S., Chumakova, K., Kawamata, N., Liu, L., and Koeffler, H. P. (2007). Adaptor protein Lnk negatively regulates the mutant MPL, MPLW515L associated with myeloproliferative disorders. *Blood* 110, 3360-3364.
- Gery, S., Gueller, S., Nowak, V., Sohn, J., Hofmann, W. K., and Koeffler, H. P. (2009b). Expression of the adaptor protein Lnk in leukemia cells. *Exp Hematol* 37, 585-592 e582.

- Ghoreschi, K., Laurence, A., and O'Shea, J. J. (2009). Janus kinases in immune cell signaling. *Immunol Rev* 228, 273-287.
- Green, M. C., and Shultz, L. D. (1975). Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse. I. Genetics and pathology. *J Hered* 66, 250-258.
- Gudbjartsson, D. F., Bjornsdottir, U. S., Halapi, E., Helgadottir, A., Sulem, P., Jonsdottir, G. M., Thorleifsson, G., Helgadottir, H., Steinthorsdottir, V., Stefansson, H., *et al.* (2009). Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction. *Nat Genet* 41, 342-347.
- Gueller, S., Gery, S., Nowak, V., Liu, L., Serve, H., and Koeffler, H. P. (2008). Adaptor protein Lnk associates with Tyr(568) in c-Kit. *Biochem J* 415, 241-245.
- Gueller, S., Goodridge, H. S., Niebuhr, B., Xing, H., Koren-Michowitz, M., Serve, H., Underhill, D. M., Brandts, C. H., and Koeffler, H. P. (2010). Adaptor protein Lnk inhibits c-Fms-mediated macrophage function. *J Leukoc Biol* 88, 699-706.
- Gueller, S., Hehn, S., Nowak, V., Gery, S., Serve, H., Brandts, C. H., and Koeffler, H. P. (2011). Adaptor protein Lnk binds to PDGF receptor and inhibits PDGF-dependent signaling. *Exp Hematol* 39, 591-600.
- Ha, J. S., and Jeon, D. S. (2011). Possible new LNK mutations in myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 86, 866-868.
- Haan, C., Kreis, S., Margue, C., and Behrmann, I. (2006). Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol* 72, 1538-1546.
- Hall, D. J., Cui, J., Bates, M. E., Stout, B. A., Koenderman, L., Coffey, P. J., and Bertics, P. J. (2001). Transduction of a dominant-negative H-Ras into human eosinophils attenuates extracellular signal-regulated kinase activation and interleukin-5-mediated cell viability. *Blood* 98, 2014-2021.
- Harrison, C., Kiladjian, J. J., Al-Ali, H. K., Gisslinger, H., Waltzman, R., Stalbovskaya, V., McQuitty, M., Hunter, D. S., Levy, R., Knoops, L., *et al.* (2012). JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* 366, 787-798.
- Harrison, D. A. (2012). The Jak/STAT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Herce, H. D., and Garcia, A. E. (2007). Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20805-20810.

- Hu, J., and Hubbard, S. R. (2006). Structural basis for phosphotyrosine recognition by the Src homology-2 domains of the adapter proteins SH2-B and APS. *J Mol Biol* 361, 69-79.
- Hu, J., Liu, J., Ghirlando, R., Saltiel, A. R., and Hubbard, S. R. (2003). Structural basis for recruitment of the adaptor protein APS to the activated insulin receptor. *Mol Cell* 12, 1379-1389.
- Huang, X., Cho, S., and Spangrude, G. J. (2007). Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ* 14, 1851-1859.
- Huang, X., Li, Y., Tanaka, K., Moore, K. G., and Hayashi, J. I. (1995). Cloning and characterization of Lnk, a signal transduction protein that links T-cell receptor activation signal to phospholipase C gamma 1, Grb2, and phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11618-11622.
- Hunt, K. A., Zhernakova, A., Turner, G., Heap, G. A., Franke, L., Bruinenberg, M., Romanos, J., Dinesen, L. C., Ryan, A. W., Panesar, D., *et al.* (2008). Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet* 40, 395-402.
- Hurtado, C., Erquiaga, I., Aranaz, P., Migueliz, I., Garcia-Delgado, M., Novo, F. J., and Vizmanos, J. L. (2011). LNK can also be mutated outside PH and SH2 domains in myeloproliferative neoplasms with and without V617FJAK2 mutation. *Leuk Res* 35, 1537-1539.
- Iseki, M., Kubo, C., Kwon, S. M., Yamaguchi, A., Kataoka, Y., Yoshida, N., Takatsu, K., and Takaki, S. (2004). Increased numbers of B-1 cells and enhanced responses against TI-2 antigen in mice lacking APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains. *Mol Cell Biol* 24, 2243-2250.
- Iseki, M., Kubo-Akashi, C., Kwon, S. M., Yamaguchi, A., Takatsu, K., and Takaki, S. (2005). APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains, has a negative regulatory role in B cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 330, 1005-1013.
- Iseki, M., Takaki, S., and Takatsu, K. (2000). Molecular cloning of the mouse APS as a member of the Lnk family adaptor proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 272, 45-54.
- Ivashkiv, L. B., and Hu, X. (2004). Signaling by STATs. *Arthritis Res Ther* 6, 159-168.
- Iwasaki, H., and Akashi, K. (2007). Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* 26, 6687-6696.

- James, C., Ugo, V., Le Couedic, J. P., Staerk, J., Delhommeau, F., Lacout, C., Garcon, L., Raslova, H., Berger, R., Bennaceur-Griscelli, A., *et al.* (2005). A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* *434*, 1144-1148.
- Javadi, M., Hofstatter, E., Stickle, N., Beattie, B. K., Jaster, R., Carter-Su, C., and Barber, D. L. (2012). The SH2B1 adaptor protein associates with a proximal region of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem* *287*, 26223-26234.
- Jiang, J., Balcerek, J., Rozenova, K., Cheng, Y., Bersenev, A., Wu, C., Song, Y., and Tong, W. (2012). 14-3-3 regulates the LNK/JAK2 pathway in mouse hematopoietic stem and progenitor cells. *J Clin Invest* *122*, 2079-2091.
- Jones, A. V., Chase, A., Silver, R. T., Oscier, D., Zoi, K., Wang, Y. L., Cario, H., Pahl, H. L., Collins, A., Reiter, A., *et al.* (2009). JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* *41*, 446-449.
- Jones, S. W., Christison, R., Bundell, K., Voyce, C. J., Brockbank, S. M., Newham, P., and Lindsay, M. A. (2005). Characterisation of cell-penetrating peptide-mediated peptide delivery. *Br J Pharmacol* *145*, 1093-1102.
- Katsanakis, K. D., and Pillay, T. S. (2005). Cross-talk between the two divergent insulin signaling pathways is revealed by the protein kinase B (Akt)-mediated phosphorylation of adapter protein APS on serine 588. *J Biol Chem* *280*, 37827-37832.
- Kearney, L., Gonzalez De Castro, D., Yeung, J., Procter, J., Horsley, S. W., Eguchi-Ishimae, M., Bateman, C. M., Anderson, K., Chaplin, T., Young, B. D., *et al.* (2009). Specific JAK2 mutation (JAK2R683) and multiple gene deletions in Down syndrome acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *113*, 646-648.
- Kent, D., Copley, M., Benz, C., Dykstra, B., Bowie, M., and Eaves, C. (2008). Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway. *Clin Cancer Res* *14*, 1926-1930.
- Khwaja, A. (2006). The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol* *134*, 366-384.
- Kiladjian, J. J., Cassinat, B., Chevret, S., Turlure, P., Cambier, N., Roussel, M., Bellucci, S., Grandchamp, B., Chomienne, C., and Fenaux, P. (2008). Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood* *112*, 3065-3072.

- Kilpivaara, O., Mukherjee, S., Schram, A. M., Wadleigh, M., Mullally, A., Ebert, B. L., Bass, A., Marubayashi, S., Heguy, A., Garcia-Manero, G., *et al.* (2009). A germline JAK2 SNP is associated with predisposition to the development of JAK2(V617F)-positive myeloproliferative neoplasms. *Nat Genet* 41, 455-459.
- Kishi, K., Mawatari, K., Sakai-Wakamatsu, K., Yuasa, T., Wang, M., Ogura-Sawa, M., Nakaya, Y., Hatakeyama, S., and Ebina, Y. (2007). APS-mediated ubiquitination of the insulin receptor enhances its internalization, but does not induce its degradation. *Endocr J* 54, 77-88.
- Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661-672.
- Koren-Michowitz, M., Gery, S., Tabayashi, T., Lin, D., Alvarez, R., Nagler, A., and Koeffler, H. P. (2013). SH2B3 (LNK) mutations from myeloproliferative neoplasms patients have mild loss of function against wild type JAK2 and JAK2 V617F. *Br J Haematol* 161, 811-820.
- Kotani, K., Wilden, P., and Pillay, T. S. (1998). SH2-B α is an insulin-receptor adapter protein and substrate that interacts with the activation loop of the insulin-receptor kinase. *Biochem J* 335 (Pt 1), 103-109.
- Kralovics, R., Passamonti, F., Buser, A. S., Teo, S. S., Tiedt, R., Passweg, J. R., Tichelli, A., Cazzola, M., and Skoda, R. C. (2005). A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352, 1779-1790.
- Kubo-Akashi, C., Iseki, M., Kwon, S. M., Takizawa, H., Takatsu, K., and Takaki, S. (2004). Roles of a conserved family of adaptor proteins, Lnk, SH2-B, and APS, for mast cell development, growth, and functions: APS-deficiency causes augmented degranulation and reduced actin assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 356-362.
- Kurzer, J. H., Saharinen, P., Silvennoinen, O., and Carter-Su, C. (2006). Binding of SH2-B family members within a potential negative regulatory region maintains JAK2 in an active state. *Mol Cell Biol* 26, 6381-6394.
- Kuter, D. J. (2013). The biology of thrombopoietin and thrombopoietin receptor agonists. *Int J Hematol* 98, 10-23.
- Kwon, S. M., Suzuki, T., Kawamoto, A., Ii, M., Eguchi, M., Akimaru, H., Wada, M., Matsumoto, T., Masuda, H., Nakagawa, Y., *et al.* (2009). Pivotal role of lnk adaptor protein in endothelial progenitor cell biology for vascular regeneration. *Circ Res* 104, 969-977.

- Lasho, T. L., Pardanani, A., and Tefferi, A. (2010). LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. *N Engl J Med* 363, 1189-1190.
- Lasho, T. L., Tefferi, A., Finke, C., and Pardanani, A. (2011). Clonal hierarchy and allelic mutation segregation in a myelofibrosis patient with two distinct LNK mutations. *Leukemia* 25, 1056-1058.
- Lataillade, J. J., Pierre-Louis, O., Hasselbalch, H. C., Uzan, G., Jasmin, C., Martyre, M. C., Le Bousse-Kerdiles, M. C., French, I., and the European, E. N. o. M. (2008). Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood* 112, 3026-3035.
- Lavrikova, E. Y., Nikitin, A. G., Kuraeva, T. L., Peterkova, V. A., Tsitlidze, N. M., Chistiakov, D. A., and Nosikov, V. V. (2011). The carriage of the type 1 diabetes-associated R262W variant of human LNK correlates with increased proliferation of peripheral blood monocytes in diabetic patients. *Pediatr Diabetes* 12, 127-132.
- Lemmon, M. A. (2007). Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp*, 81-93.
- Lennartsson, J., and Ronnstrand, L. (2012). Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. *Physiol Rev* 92, 1619-1649.
- Lesteven, E., Picque, M., Conejero Tonetti, C., Giraudier, S., Varin-Blank, N., Velazquez, L., Kiladjian, J. J., Cassinat, B., and Baran-Marszak, F. (2014). Association of a single-nucleotide polymorphism in the SH2B3 gene with JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Blood* 123, 794-796.
- Levine, R. L., Wadleigh, M., Cools, J., Ebert, B. L., Wernig, G., Huntly, B. J., Boggon, T. J., Wlodarska, I., Clark, J. J., Moore, S., *et al.* (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7, 387-397.
- Li, J., Kent, D. G., Chen, E., and Green, A. R. (2011). Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. *Dis Model Mech* 4, 311-317.
- Li, M., Cha, D. J., Lai, Y., Villaruz, A. E., Sturdevant, D. E., and Otto, M. (2007a). The antimicrobial peptide-sensing system *aps* of *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 66, 1136-1147.
- Li, Y., He, X., Schembri-King, J., Jakes, S., and Hayashi, J. (2000). Cloning and characterization of human Lnk, an adaptor protein with pleckstrin

homology and Src homology 2 domains that can inhibit T cell activation. *J Immunol* 164, 5199-5206.

- Li, Z., Zhou, Y., Carter-Su, C., Myers, M. G., Jr., and Rui, L. (2007b). SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Mol Endocrinol* 21, 2270-2281.
- Lin, D. C., Yin, T., Koren-Michowitz, M., Ding, L. W., Gueller, S., Gery, S., Tabayashi, T., Bergholz, U., Kazi, J. U., Ronnstrand, L., *et al.* (2012). Adaptor protein Lnk binds to and inhibits normal and leukemic FLT3. *Blood* 120, 3310-3317.
- Linossi, E. M., and Nicholson, S. E. (2015). Kinase inhibition, competitive binding and proteasomal degradation: resolving the molecular function of the suppressor of cytokine signaling (SOCS) proteins. *Immunol Rev* 266, 123-133.
- Liu, F., Zhao, X., Perna, F., Wang, L., Koppikar, P., Abdel-Wahab, O., Harr, M. W., Levine, R. L., Xu, H., Tefferi, A., *et al.* (2011). JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell* 19, 283-294.
- Liu, J., Kimura, A., Baumann, C. A., and Saltiel, A. R. (2002). APS facilitates c-Cbl tyrosine phosphorylation and GLUT4 translocation in response to insulin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biol* 22, 3599-3609.
- Looi, C. Y., Imanishi, M., Takaki, S., Sato, M., Chiba, N., Sasahara, Y., Futaki, S., Tsuchiya, S., and Kumaki, S. (2011). Octa-arginine mediated delivery of wild-type Lnk protein inhibits TPO-induced M-MOK megakaryoblastic leukemic cell growth by promoting apoptosis. *PLoS One* 6, e23640.
- Loscocco, G. G., Mannarelli, C., Pacilli, A., Fanelli, T., Rotunno, G., Gesullo, F., Corbizi-Fattori, G., Vannucchi, A. M., and Guglielmelli, P. (2016). Germline transmission of LNKE208Q variant in a family with myeloproliferative neoplasms. *Am J Hematol* 91, E356.
- Lu, X., Levine, R., Tong, W., Wernig, G., Pikman, Y., Zarnegar, S., Gilliland, D. G., and Lodish, H. (2005). Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18962-18967.
- Ma, G. S., Aznar, N., Kalogriopoulos, N., Midde, K. K., Lopez-Sanchez, I., Sato, E., Dunkel, Y., Gallo, R. L., and Ghosh, P. (2015). Therapeutic effects of cell-permeant peptides that activate G proteins downstream of growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E2602-2610.

- Machida, K., and Mayer, B. J. (2005). The SH2 domain: versatile signaling module and pharmaceutical target. *Biochim Biophys Acta* 1747, 1-25.
- Marty, C., Pecquet, C., Nivarthi, H., El-Khoury, M., Chachoua, I., Tulliez, M., Villeval, J. L., Raslova, H., Kralovics, R., Constantinescu, S. N., *et al.* (2016). Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* 127, 1317-1324.
- Marty, C., Saint-Martin, C., Pecquet, C., Grosjean, S., Saliba, J., Mouton, C., Leroy, E., Harutyunyan, A. S., Abgrall, J. F., Favier, R., *et al.* (2014). Germ-line JAK2 mutations in the kinase domain are responsible for hereditary thrombocytosis and are resistant to JAK2 and HSP90 inhibitors. *Blood* 123, 1372-1383.
- Maures, T. J., Chen, L., and Carter-Su, C. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling of the adapter protein SH2B1beta (SH2-Bbeta) is required for nerve growth factor (NGF)-dependent neurite outgrowth and enhancement of expression of a subset of NGF-responsive genes. *Mol Endocrinol* 23, 1077-1091.
- Maures, T. J., Kurzer, J. H., and Carter-Su, C. (2007). SH2B1 (SH2-B) and JAK2: a multifunctional adaptor protein and kinase made for each other. *Trends Endocrinol Metab* 18, 38-45.
- McMullin, M. F., Wu, C., Percy, M. J., and Tong, W. (2011). A nonsynonymous LNK polymorphism associated with idiopathic erythrocytosis. *Am J Hematol* 86, 962-964.
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485-491.
- Metcalf, D., and Burgess, A. W. (1982). Clonal analysis of progenitor cell commitment of granulocyte or macrophage production. *J Cell Physiol* 111, 275-283.
- Milosevic, J. D., and Kralovics, R. (2013). Genetic and epigenetic alterations of myeloproliferative disorders. *Int J Hematol* 97, 183-197.
- Minami, A., Iseki, M., Kishi, K., Wang, M., Ogura, M., Furukawa, N., Hayashi, S., Yamada, M., Obata, T., Takeshita, Y., *et al.* (2003). Increased insulin sensitivity and hypoinsulinemia in APS knockout mice. *Diabetes* 52, 2657-2665.
- Mohapatra, B., Ahmad, G., Nadeau, S., Zutshi, N., An, W., Scheffe, S., Dong, L., Feng, D., Goetz, B., Arya, P., *et al.* (2013). Protein tyrosine kinase regulation by ubiquitination: critical roles of Cbl-family ubiquitin ligases. *Biochim Biophys Acta* 1833, 122-139.

- Moodie, S. A., Alleman-Sposeto, J., and Gustafson, T. A. (1999). Identification of the APS protein as a novel insulin receptor substrate. *J Biol Chem* 274, 11186-11193.
- Mori, T., Iwasaki, Y., Seki, Y., Iseki, M., Katayama, H., Yamamoto, K., Takatsu, K., and Takaki, S. (2014). Lnk/Sh2b3 controls the production and function of dendritic cells and regulates the induction of IFN-gamma-producing T cells. *J Immunol* 193, 1728-1736.
- Morrison, D. K. (2009). The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol* 19, 16-23.
- Mullally, A., Lane, S. W., Brumme, K., and Ebert, B. L. (2012). Myeloproliferative neoplasm animal models. *Hematol Oncol Clin North Am* 26, 1065-1081.
- Naudin, C., Chevalier, C., and Roche, S. (2016). The role of small adaptor proteins in the control of oncogenic signaling driven by tyrosine kinases in human cancer. *Oncotarget* 7, 11033-11055.
- Neel, B. G., and Tonks, N. K. (1997). Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 9, 193-204.
- Nelms, K., O'Neill, T. J., Li, S., Hubbard, S. R., Gustafson, T. A., and Paul, W. E. (1999). Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain. *Mamm Genome* 10, 1160-1167.
- Nishi, M., Werner, E. D., Oh, B. C., Frantz, J. D., Dhe-Paganon, S., Hansen, L., Lee, J., and Shoelson, S. E. (2005). Kinase activation through dimerization by human SH2-B. *Mol Cell Biol* 25, 2607-2621.
- Nobuhisa, I., Takizawa, M., Takaki, S., Inoue, H., Okita, K., Ueno, M., Takatsu, K., and Taga, T. (2003). Regulation of hematopoietic development in the aorta-gonad-mesonephros region mediated by Lnk adaptor protein. *Mol Cell Biol* 23, 8486-8494.
- O'Brien, K. B., O'Shea, J. J., and Carter-Su, C. (2002). SH2-B family members differentially regulate JAK family tyrosine kinases. *J Biol Chem* 277, 8673-8681.
- Oh, S. T., Simonds, E. F., Jones, C., Hale, M. B., Goltsev, Y., Gibbs, K. D., Jr., Merker, J. D., Zehnder, J. L., Nolan, G. P., and Gotlib, J. (2010). Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. *Blood* 116, 988-992.

- Ohtsuka, S., Takaki, S., Iseki, M., Miyoshi, K., Nakagata, N., Kataoka, Y., Yoshida, N., Takatsu, K., and Yoshimura, A. (2002). SH2-B is required for both male and female reproduction. *Mol Cell Biol* 22, 3066-3077.
- Okayama, Y., and Kawakami, T. (2006). Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol Res* 34, 97-115.
- Osborne, M. A., Dalton, S., and Kochan, J. P. (1995). The yeast tribrid system-genetic detection of trans-phosphorylated ITAM-SH2-interactions. *Biotechnology (N Y)* 13, 1474-1478.
- Pardanani, A., Lasho, T., Finke, C., Oh, S. T., Gotlib, J., and Tefferi, A. (2010). LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* 24, 1713-1718.
- Pardanani, A. D., Levine, R. L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R. A., Wadleigh, M., Steensma, D. P., Elliott, M. A., Wolanskyj, A. P., Hogan, W. J., *et al.* (2006). MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108, 3472-3476.
- Park, S. O., Wamsley, H. L., Bae, K., Hu, Z., Li, X., Choe, S. W., Slayton, W. B., Oh, S. P., Wagner, K. U., and Sayeski, P. P. (2013). Conditional deletion of Jak2 reveals an essential role in hematopoiesis throughout mouse ontogeny: implications for Jak2 inhibition in humans. *PLoS One* 8, e59675.
- Pasquier, F., Cabagnols, X., Secardin, L., Plo, I., and Vainchenker, W. (2014). Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 14 *Suppl*, S23-35.
- Pawson, T., and Scott, J. D. (1997). Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science* 278, 2075-2080.
- Perez-Garcia, A., Ambesi-Impiombato, A., Hadler, M., Rigo, I., LeDuc, C. A., Kelly, K., Jalas, C., Paietta, E., Racevskis, J., Rowe, J. M., *et al.* (2013). Genetic loss of SH2B3 in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122, 2425-2432.
- Pietra, D., Li, S., Brisci, A., Passamonti, F., Rumi, E., Theocharides, A., Ferrari, M., Gisslinger, H., Kralovics, R., Cremonesi, L., *et al.* (2008). Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood* 111, 1686-1689.
- Pikman, Y., Lee, B. H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B. L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., *et al.* (2006). MPLW515L is a novel

somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 3, e270.

- Polak, R., and Buitenhuis, M. (2012). The PI3K/PKB signaling module as key regulator of hematopoiesis: implications for therapeutic strategies in leukemia. *Blood* 119, 911-923.
- Qian, X., and Ginty, D. D. (2001). SH2-B and APS are multimeric adapters that augment TrkA signaling. *Mol Cell Biol* 21, 1613-1620.
- Ramsey, J. D., and Flynn, N. H. (2015). Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol Ther* 154, 78-86.
- Raucher, D., and Ryu, J. S. (2015). Cell-penetrating peptides: strategies for anticancer treatment. *Trends Mol Med* 21, 560-570.
- Reddy, E. P., Korapati, A., Chaturvedi, P., and Rane, S. (2000). IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* 19, 2532-2547.
- Regberg, J., Srimanee, A., and Langel, U. (2012). Applications of cell-penetrating peptides for tumor targeting and future cancer therapies. *Pharmaceuticals (Basel)* 5, 991-1007.
- Ren, D., Li, M., Duan, C., and Rui, L. (2005). Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab* 2, 95-104.
- Riedel, H., Wang, J., Hansen, H., and Yousaf, N. (1997). PSM, an insulin-dependent, pro-rich, PH, SH2 domain containing partner of the insulin receptor. *J Biochem* 122, 1105-1113.
- Rizzuti, M., Nizzardo, M., Zanetta, C., Ramirez, A., and Corti, S. (2015). Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today* 20, 76-85.
- Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715-6723.
- Roberts, K. G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., Yang, Y. L., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., *et al.* (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 371, 1005-1015.

- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., and Jones, S. A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80, 227-236.
- Roskoski, R., Jr. (2015). Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 94, 9-25.
- Roskoski, R., Jr. (2016). Janus kinase (JAK) inhibitors in the treatment of inflammatory and neoplastic diseases. *Pharmacol Res* 111, 784-803.
- Rui, L. (2014). SH2B1 regulation of energy balance, body weight, and glucose metabolism. *World J Diabetes* 5, 511-526.
- Rui, L., and Carter-Su, C. (1998). Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates the association of SH2-Bbeta with PDGF receptor and phosphorylation of SH2-Bbeta. *J Biol Chem* 273, 21239-21245.
- Rui, L., Gunter, D. R., Herrington, J., and Carter-Su, C. (2000). Differential binding to and regulation of JAK2 by the SH2 domain and N-terminal region of SH2-bbeta. *Mol Cell Biol* 20, 3168-3177.
- Rui, L., Herrington, J., and Carter-Su, C. (1999a). SH2-B is required for nerve growth factor-induced neuronal differentiation. *J Biol Chem* 274, 10590-10594.
- Rui, L., Herrington, J., and Carter-Su, C. (1999b). SH2-B, a membrane-associated adapter, is phosphorylated on multiple serines/threonines in response to nerve growth factor by kinases within the MEK/ERK cascade. *J Biol Chem* 274, 26485-26492.
- Rui, L., Mathews, L. S., Hotta, K., Gustafson, T. A., and Carter-Su, C. (1997). Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling. *Mol Cell Biol* 17, 6633-6644.
- Rumi, E., Harutyunyan, A. S., Pietra, D., Feenstra, J. D., Cavalloni, C., Roncoroni, E., Casetti, I., Bellini, M., Milanesi, C., Renna, M. C., *et al.* (2016). LNK mutations in familial myeloproliferative neoplasms. *Blood* 128, 144-145.
- Saharinen, P., Takaluoma, K., and Silvennoinen, O. (2000). Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol* 20, 3387-3395.
- Scott, L. M., Tong, W., Levine, R. L., Scott, M. A., Beer, P. A., Stratton, M. R., Futreal, P. A., Erber, W. N., McMullin, M. F., Harrison, C. N., *et al.* (2007). JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med* 356, 459-468.

- Seita, J., Ema, H., Oeohara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., and Nakauchi, H. (2007). Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 2349-2354.
- Seow, Y., and Wood, M. J. (2009). Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors. *Mol Ther* 17, 767-777.
- Severin, S., Ghevaert, C., and Mazharian, A. (2010). The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *J Thromb Haemost* 8, 17-26.
- Shan, Y., Gnanasambandan, K., Ungureanu, D., Kim, E. T., Hammaren, H., Yamashita, K., Silvennoinen, O., Shaw, D. E., and Hubbard, S. R. (2014). Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase. *Nat Struct Mol Biol* 21, 579-584.
- Sharma, Y., Bashir, S., Bhardwaj, P., Ahmad, A., and Khan, F. (2016). Protein tyrosine phosphatase SHP-1: resurgence as new drug target for human autoimmune disorders. *Immunol Res* 64, 804-819.
- Shivakrupa, R., and Linnekin, D. (2005). Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells. *Cell Signal* 17, 103-109.
- Silva, C. M. (2004). Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23, 8017-8023.
- Simon, C., Dondi, E., Chaix, A., de Sepulveda, P., Kubiseski, T. J., Varin-Blank, N., and Velazquez, L. (2008). Lnk adaptor protein down-regulates specific Kit-induced signaling pathways in primary mast cells. *Blood* 112, 4039-4047.
- Skoda, R. C., Duek, A., and Grisouard, J. (2015). Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol* 43, 599-608.
- Skotland, T., Iversen, T. G., Torgersen, M. L., and Sandvig, K. (2015). Cell-penetrating peptides: possibilities and challenges for drug delivery in vitro and in vivo. *Molecules* 20, 13313-13323.
- Sochacki, A. L., Fischer, M. A., and Savona, M. R. (2016). Therapeutic approaches in myelofibrosis and myelodysplastic/myeloproliferative overlap syndromes. *Onco Targets Ther* 9, 2273-2286.
- Spolverini, A., Pieri, L., Guglielmelli, P., Pancrazzi, A., Fanelli, T., Paoli, C., Bosi, A., Nichele, I., Ruggeri, M., and Vannucchi, A. M. (2013). Infrequent

occurrence of mutations in the PH domain of LNK in patients with JAK2 mutation-negative 'idiopathic' erythrocytosis. *Haematologica* 98, e101-102.

- Staerk, J., Lacout, C., Sato, T., Smith, S. O., Vainchenker, W., and Constantinescu, S. N. (2006). An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 107, 1864-1871.
- Suzuki, N., Yamazaki, S., Ema, H., Yamaguchi, T., Nakauchi, H., and Takaki, S. (2012). Homeostasis of hematopoietic stem cells regulated by the myeloproliferative disease associated-gene product Lnk/Sh2b3 via Bcl-xL. *Exp Hematol* 40, 166-174 e163.
- Takaki, S., Morita, H., Tezuka, Y., and Takatsu, K. (2002). Enhanced hematopoiesis by hematopoietic progenitor cells lacking intracellular adaptor protein, Lnk. *J Exp Med* 195, 151-160.
- Takaki, S., Sauer, K., Iritani, B. M., Chien, S., Ebihara, Y., Tsuji, K., Takatsu, K., and Perlmutter, R. M. (2000). Control of B cell production by the adaptor protein Lnk. Definition Of a conserved family of signal-modulating proteins. *Immunity* 13, 599-609.
- Takaki, S., Watts, J. D., Forbush, K. A., Nguyen, N. T., Hayashi, J., Alberola-Ila, J., Aebersold, R., and Perlmutter, R. M. (1997). Characterization of Lnk. An adaptor protein expressed in lymphocytes. *J Biol Chem* 272, 14562-14570.
- Takizawa, H., Eto, K., Yoshikawa, A., Nakauchi, H., Takatsu, K., and Takaki, S. (2008). Growth and maturation of megakaryocytes is regulated by Lnk/Sh2b3 adaptor protein through crosstalk between cytokine- and integrin-mediated signals. *Exp Hematol* 36, 897-906.
- Takizawa, H., Kubo-Akashi, C., Nobuhisa, I., Kwon, S. M., Iseki, M., Taga, T., Takatsu, K., and Takaki, S. (2006). Enhanced engraftment of hematopoietic stem/progenitor cells by the transient inhibition of an adaptor protein, Lnk. *Blood* 107, 2968-2975.
- Takizawa, H., Nishimura, S., Takayama, N., Oda, A., Nishikii, H., Morita, Y., Kakinuma, S., Yamazaki, S., Okamura, S., Tamura, N., *et al.* (2010). Lnk regulates integrin α IIb β 3 outside-in signaling in mouse platelets, leading to stabilization of thrombus development in vivo. *J Clin Invest* 120, 179-190.
- Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255.

- Tefferi, A. (2016). Somatic JAK2 mutations and their tumor phenotypes. *Blood* 128, 748-749.
- Tefferi, A., Vaidya, R., Caramazza, D., Finke, C., Lasho, T., and Pardanani, A. (2011). Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol* 29, 1356-1363.
- Tilbrook, P. A., Ingley, E., Williams, J. H., Hibbs, M. L., and Klinken, S. P. (1997). Lyn tyrosine kinase is essential for erythropoietin-induced differentiation of J2E erythroid cells. *EMBO J* 16, 1610-1619.
- Tong, W., and Lodish, H. F. (2004). Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J Exp Med* 200, 569-580.
- Tong, W., Zhang, J., and Lodish, H. F. (2005). Lnk inhibits erythropoiesis and Epo-dependent JAK2 activation and downstream signaling pathways. *Blood* 105, 4604-4612.
- Ungureanu, D., Wu, J., Pekkala, T., Niranjana, Y., Young, C., Jensen, O. N., Xu, C. F., Neubert, T. A., Skoda, R. C., Hubbard, S. R., and Silvennoinen, O. (2011). The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol* 18, 971-976.
- Vainchenker, W., Constantinescu, S. N., and Plo, I. (2016). Recent advances in understanding myelofibrosis and essential thrombocythemia. *F1000Res* 5.
- Vainchenker, W., Delhommeau, F., Constantinescu, S. N., and Bernard, O. A. (2011). New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood* 118, 1723-1735.
- Vakil, E., and Tefferi, A. (2011). BCR-ABL1-negative myeloproliferative neoplasms: a review of molecular biology, diagnosis, and treatment. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 11 Suppl 1, S37-45.
- Varghese, L. N., Ungureanu, D., Liao, N. P., Young, S. N., Laktyushin, A., Hammaren, H., Lucet, I. S., Nicola, N. A., Silvennoinen, O., Babon, J. J., and Murphy, J. M. (2014). Mechanistic insights into activation and SOCS3-mediated inhibition of myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 mutants from biochemical and structural analyses. *Biochem J* 458, 395-405.
- Velazquez (2012a). Hematopoiesis – Science and Practice, Negative regulation of haematopoiesis : role of inhibitory adaptor).

- Velazquez, L. (2012b). The Lnk adaptor protein: a key regulator of normal and pathological hematopoiesis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 60, 415-429.
- Velazquez, L., Cheng, A. M., Fleming, H. E., Furlonger, C., Vesely, S., Bernstein, A., Paige, C. J., and Pawson, T. (2002). Cytokine signaling and hematopoietic homeostasis are disrupted in Lnk-deficient mice. *J Exp Med* 195, 1599-1611.
- Verstovsek, S., Mesa, R. A., Gotlib, J., Levy, R. S., Gupta, V., DiPersio, J. F., Catalano, J. V., Deininger, M., Miller, C., Silver, R. T., *et al.* (2012). A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *N Engl J Med* 366, 799-807.
- Vives, E., Schmidt, J., and Pelegrin, A. (2008). Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim Biophys Acta* 1786, 126-138.
- Wagner, M. J., Stacey, M. M., Liu, B. A., and Pawson, T. (2013). Molecular mechanisms of SH2- and PTB-domain-containing proteins in receptor tyrosine kinase signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a008987.
- Wakioka, T., Sasaki, A., Mitsui, K., Yokouchi, M., Inoue, A., Komiya, S., and Yoshimura, A. (1999). APS, an adaptor protein containing Pleckstrin homology (PH) and Src homology-2 (SH2) domains inhibits the JAK-STAT pathway in collaboration with c-Cbl. *Leukemia* 13, 760-767.
- Wan, M., Li, Y., Xue, H., Li, Q., and Li, J. (2006). TNF-alpha induces Lnk expression through PI3K-dependent signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *J Surg Res* 136, 53-57.
- Wang, T. C., Chiu, H., Chang, Y. J., Hsu, T. Y., Chiu, I. M., and Chen, L. (2011). The adaptor protein SH2B3 (Lnk) negatively regulates neurite outgrowth of PC12 cells and cortical neurons. *PLoS One* 6, e26433.
- Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zurcher, G., and Ziemiecki, A. (1991). Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* 11, 2057-2065.
- Wollberg, P., Lennartsson, J., Gottfridsson, E., Yoshimura, A., and Ronnstrand, L. (2003). The adapter protein APS associates with the multifunctional docking sites Tyr-568 and Tyr-936 in c-Kit. *Biochem J* 370, 1033-1038.
- Wu, H., Liu, X., Jaenisch, R., and Lodish, H. F. (1995). Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell* 83, 59-67.

- Yabana, N., and Shibuya, M. (2002). Adaptor protein APS binds the NH₂-terminal autoinhibitory domain of guanine nucleotide exchange factor Vav3 and augments its activity. *Oncogene* 21, 7720-7729.
- Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E., 3rd, Silvennoinen, O., and O'Shea, J. J. (2004). The Janus kinases (Jaks). *Genome Biol* 5, 253.
- Yokouchi, M., Suzuki, R., Masuhara, M., Komiya, S., Inoue, A., and Yoshimura, A. (1997). Cloning and characterization of APS, an adaptor molecule containing PH and SH2 domains that is tyrosine phosphorylated upon B-cell receptor stimulation. *Oncogene* 15, 7-15.
- Yokouchi, M., Wakioka, T., Sakamoto, H., Yasukawa, H., Ohtsuka, S., Sasaki, A., Ohtsubo, M., Valius, M., Inoue, A., Komiya, S., and Yoshimura, A. (1999). APS, an adaptor protein containing PH and SH2 domains, is associated with the PDGF receptor and c-Cbl and inhibits PDGF-induced mitogenesis. *Oncogene* 18, 759-767.
- Yousaf, N., Deng, Y., Kang, Y., and Riedel, H. (2001). Four PSM/SH2-B alternative splice variants and their differential roles in mitogenesis. *J Biol Chem* 276, 40940-40948.
- Zhernakova, A., Elbers, C. C., Ferwerda, B., Romanos, J., Trynka, G., Dubois, P. C., de Kovel, C. G., Franke, L., Oosting, M., Barisani, D., *et al.* (2010). Evolutionary and functional analysis of celiac risk loci reveals SH2B3 as a protective factor against bacterial infection. *Am J Hum Genet* 86, 970-977.
- Zorko, M., and Langel, U. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 57, 529-545.

Implication physiopathologique de l'adaptateur LNK : mécanismes d'action et perspectives thérapeutiques dans les Néoplasmes Myéloprolifératifs

L'adaptateur LNK est un régulateur négatif des voies de signalisation, dont la voie JAK/STAT, essentielle au développement du système hématopoïétique. Son implication dans les hémopathies chroniques, notamment les Néoplasmes Myéloprolifératifs (NMP), a été mise en évidence par l'analyse de souris invalidées pour cet adaptateur et l'identification de mutations de *LNK* chez les patients atteints de ces pathologies. Toutefois, le mécanisme permettant la régulation de ses partenaires, dont la kinase JAK2, et l'implication fonctionnelle des mutations de *LNK* dans les NMP, restent à définir. Ainsi, mon projet de thèse a porté sur l'analyse structurale et fonctionnelle des complexes de signalisation LNK/JAK2 et sur le développement d'une stratégie moléculaire pour l'utilisation thérapeutique de LNK dans les NMP. Nos résultats ont montré pour la première fois, la fonction inhibitrice de la région N-terminale incluant le domaine d'homologie à la Pleckstrine de LNK sur JAK2 normale et de manière plus importante, sur la forme mutée JAK2-V617F, retrouvée chez les patients atteints de NMP. De plus, nos études sur les mutations de *LNK* localisées dans cette région régulatrice, ont permis de comprendre leur contribution dans le développement de ces hémopathies et de proposer un mécanisme d'inhibition de l'activation de JAK2 par LNK. Nos résultats permettent d'utiliser le ciblage de la région N-terminale de LNK comme stratégie moléculaire inhibant spécifiquement la forme oncogénique JAK2-V617F à l'aide de peptides pénétrants (CPP). A long terme, cette approche pourrait être utilisée comme outil thérapeutique dans le traitement de patients atteints de NMP positifs pour JAK2-V617F.

Physiopathological implication of LNK adaptor: mechanisms of action and therapeutic applications in myeloproliferative neoplasms

The LNK adaptor protein is a key negative regulator of signalling pathways, such as JAK/STAT, important in the development of the hematopoietic system. Its implication in chronic blood diseases, such as Myeloproliferative Neoplasms (MPN) has been confirmed by studies on *Lnk*-deficient mice, as well as the identification of *LNK* mutations in MPN patients. However, the LNK mechanism of regulation on its partners and the functional implication of *LNK* mutations in MPN pathogenesis, are still unclear. Therefore, my PhD project covers the structural and functional analysis of the LNK/JAK2 signalling complex and the development of a molecular strategy to use LNK as a therapeutic tool for the treatment of MPN patients. Our study showed, for the first time, the inhibitory function of the N-terminal region and the pleckstrin homology domain of LNK on JAK2 activity, which occurs more importantly on JAK-V617F than JAK2 wild type form. Moreover, our study provided evidence on how LNK mutations located in this LNK region could contribute to these haematological diseases and has allowed us to propose a model for LNK regulatory function on JAK2 activity. Furthermore, we developed a cell penetrating peptide-based strategy to deliver this regulatory region of LNK in hematopoietic cells to specifically inhibit JAK2-V617F oncogenic form. The final aim is to use this region as a therapeutic molecule to treat JAK2-V617F-positive MPN patients.

Mots clés : Protéine adaptatrice, LNK, Inhibiteur de signalisation, Voie de signalisation JAK/STAT, Néoplasmes Myéloprolifératifs, Thérapie ciblée
