

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

JAK2, CYTOKINES ET RECEPTEURS DANS LA
POLYGLOBULIE DE VAQUEZ

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie-Biologie
Biologie-Médecine-santé
Cancérologie, Hématologie, biologie moléculaire

présentée
soutenue publiquement par

Marjorie BOISSINOT

Le 3 Octobre 2008, devant le jury ci-dessous

Rapporteurs :

Dr BERNET Agnès	Maître de Conférence des Universités, CNRS 5238, Lyon
Dr HERMINE Olivier	Professeur des universités-Praticien hospitalier, UMR CNRS 8147, Paris

Examineurs :

Dr PRALORAN Vincent	Professeur des universités-Praticien hospitalier, UMR CNRS 5164 Bordeaux
Dr JACQUES Yannick	Directeur de recherche, CRCNA INSERM 892, Nantes

Directrice de thèse :

Dr HERMOUET Sylvie	Maître de Conférence des Universités-Praticien hospitalier Faculté de Médecine, CRCNA INSERM 892, Nantes
--------------------	---

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	1
LISTE DES ABREVIATIONS	3
TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	6
RÉSUMÉ	7
INTRODUCTION.....	9
I. HEMATOPOÏÈSE ET SYNDROMES MYELOPROLIFÉRATIFS.....	10
<i>Hématopoïèse généralités.....</i>	<i>10</i>
<i>Erythropoïèse</i>	<i>14</i>
<i>Erythropoïétine.....</i>	<i>14</i>
<i>Syndromes myéloprolifératifs.....</i>	<i>16</i>
i. Description générale	16
ii. La Polyglobulie de Vaquez	17
a) Description.....	17
b) Présentation clinique de la Polyglobulie de Vaquez	17
iii. Thrombocythémie Essentielle.....	18
iv. Myélofibrose Primitive	18
v. Traitements des syndromes myéloprolifératifs	19
<i>Présentations atypiques des syndromes myéloprolifératifs</i>	<i>21</i>
i. Thromboses digestives profondes	21
II. CYTOKINES ET RECEPTEURS LIES A JAK2.....	22
<i>Les cytokines.....</i>	<i>22</i>
i. Description générale	22
ii. Le stem cell factor : SCF.....	22
iii. Le Granulocyte Stimulating Factor : G-CSF.....	23
iv. La thrombopoïétine : Tpo.....	24
v. L'interleukine 6	24
vi. L'interleukine 11	27
vii. L'interleukine 8.....	28
<i>Les récepteurs de cytokines</i>	<i>31</i>
i. Description générale	31
ii. Le récepteur de l'érythropoïétine : EpoR.....	31
iii. Le récepteur du Stem Cell Factor : c-Kit	34
iv. Le récepteur du G-CSF : GCSFR.....	38
v. Le récepteur de la thrombopoïétine : c-mpl.....	39
vi. Les récepteurs de la famille IL-6.....	39
a) L'IL-6 récepteur α	41
b) L'IL-11 récepteur α	43
c) La gp130	45
d) Les récepteurs de l'IL-8.....	47
POINT DES CONNAISSANCES	50
CYTOKINES, HEMATOPOÏÈSE ET SYNDROMES MYELOPROLIFÉRATIFS	51
I. LA TYROSINE KINASE JAK2.....	51
<i>Description générale</i>	<i>51</i>
<i>Les mutations de JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs.</i>	<i>52</i>
II. CYTOKINES ET SYNDROMES MYELOPROLIFÉRATIFS.....	55
<i>La Myélofibrose Primitive (MFP)</i>	<i>55</i>
<i>La Thrombocythémie Essentielle (TE).....</i>	<i>56</i>
<i>La Polyglobulie de Vaquez (PV)</i>	<i>57</i>
PRESENTATION DU SUJET	58
RESULTATS.....	60
I. ETUDE DE LA MUTATION JAK2 V617F DANS LES SMP.	61

<i>Etude de la fréquence de la mutation JAK2V617F au diagnostic chez des patients atteints de PV et de TE.</i>	61
i. Introduction.....	61
II. Conclusion et commentaires.....	65
<i>Importance de la détection de la mutation JAK2V617F dans le diagnostic d'un SMP latent.</i>	66
i. Etude de cas d'anémies réfractaires sidéroblastiques à taux de plaquettes élevé.	66
a) Introduction.....	66
b) Conclusion et commentaires.....	70
ii. Etude de cas de thromboses digestives profondes.....	71
a) Introduction.....	71
b) Conclusion et commentaires.....	75
<i>Etude de la mutation JAK2V617F lors de transformation des SMP en leucémie aigue myéloïde</i>	76
i. Introduction.....	76
ii. Conclusion et commentaires	83
III. ETUDES DES CYTOKINES DANS LA POLYGLOBULIE DE VAQUEZ	84
<i>Formation de colonies érythroïdes endogènes par les progéniteurs médullaires en présence d'interleukine 11 et d'interleukine 8.</i>	84
i. Introduction.....	84
ii. Conclusion et commentaires	95
.....	96
<i>Etude de la dérégulation de cytokines dans la polyglobulie de Vaquez : source de production, dépendance vis à vis de JAK2V617F et contribution à l'élévation de l'hématocrite.</i>	97
i. Introduction.....	97
ii. Conclusion et commentaires	125
DISCUSSION	126
I. LA MUTATION JAK2V617F DANS LES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS	127
<i>Fréquence et impact de la mutation JAK2V617F dans les SMP.</i>	127
<i>La mutation JAK2V617F dans le diagnostic de formes latentes ou masquées de SMP.</i>	129
<i>Fréquence de la mutation JAK2V617F dans les cas de leucémies aigues myéloïdes de novo et post-SMP.</i>	130
.....	130
II. DEREGULATION DE CYTOKINES DANS LA PV, LIEN AVEC JAK2V617F ET IMPLICATIONS DANS LA PATHOGENESE DE LA MALADIE.	132
<i>Cytokines et pousse endogène de colonies à partir de progéniteurs de patients atteints de SMP</i>	132
<i>Cytokines et autres molécules liées à JAK2V617F et dérégulées dans la PV</i>	135
BIBLIOGRAPHIE.....	142

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : acide désoxyribonucléique
Akt : « cellular homologue of the v-akt oncogene » ou protéine kinase B
AP-1 : activating protein 1 ou complexe transcriptionnel c-Fos/c-Jun
ARN : acide ribonucléique
ARS : anémie réfractaire sidérolastique
ARS-T : ARS avec thrombocytose
AS : allele-specific
Bcl2 : B cell leukaemia protein 2
Bcl-xL : B cell leukaemia x large form protein
BCR-ABL : break point cluster region-abelson tyrosine kinase
b-FGF : basic fibroblast growth factor
BFU-E : burst forming unit erythroid
CBD : cytokine binding domain
CD : cluster de différenciation
C/EBP : CAAT/enhancer binding protein = nuclear factor de l'IL-6
CEE : colonie érythroïde endogène
CFU-E: colony forming unit erythroid
CFU-GEMM : CFU granulocyte-érythrocyte-macrophage-mégacaryocyte
CFU-GM : CFU granulocyte-macrophage
CFU-MK : CFU mégacaryocytaire
CME : colonie mégacaryocytaire endogène
CMN : cellules mononucléées
CRH : cytokine receptor homologue
CSF : colony stimulating factor, facteur stimulant des colonies
EGF-R : récepteur de l'epithelial growth factor
EP : érythrocytose pure
Epo : érythropoïétine
ERK : extracellular signal-regulated kinase
FACS : fluorescence activated cell sorter
FERM : 4.1 ezrin, radixin, moesin
FLT-3 : « Fms-like tyrosine kinase 3 »
Gab1 : growth factor-receptor-bound-protein 2 (Grb2) associated binder 1

GATA : GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)

G-CSF : granulocytes colony stimulating factor

Gro α : growth related gene alpha

Grb2 : growth factor receptor binding protein 2

gp : glycoprotéine

Hct : hématocrite

Hgb : hémoglobine

HGF : hepatocyte growth factor

HGFA : hepatocyte growth factor activator

HIF : hypoxia inducible factor

Hox : Homéobox

HUVEC : human umbilical vein endothelial cell

IFN : interféron

IGF : insulin growth factor

IFN : interféron

IL : interleukine

JAK : janus kinase

JH : JAK homology

JNK : jun kinase

LAM : leucémie aigue myéloïde

LDH : lactate deshydrogénase

LIF : leukemia inhibitory factor

LMC : leucémie myéloïde chronique

LOH : loss of heterozygotie

MAPK : mitogen activated protein kinase

M-CSF : macrophage colony stimulating factor

MEC : matrice extracellulaire

MEK : MAPK kinase

MFP : myélofibrose primititve

MIP : macrophage inflammatory protein

MMP : métalloprotéinase de la matrice

MPP1 : membrane protein, palmitoylated 1,

NAP-2 : neutrophil activating factor 2

NF κ B : nuclear factor kappa B

OMS : organisation mondiale de la santé
OSM : oncostatine M
PCR : polymerase chain reaction
PDGF : platelet derived growth factor
PF-4 : platelet factor 4
Phi : philadelphie
Pi3K : phosphatidyl inositol 3 kinase
PLC : phospholipase C
PMA : phorbol myristate acétate
PNN : polynucléaires neutrophiles
PS : polyglobulie secondaire
PV : polyglobulie de Vaquez
SBC : syndrome de Budd-Chiari
SCF : stem cell factor, facteur de croissance des cellules souches
SH2 : src homology
SHIP : SH2-containing inositol 5' -phosphatase
SHP : SH2-containing phosphatase
SMD : syndrome myélodysplasique
SMP : syndrome myéloprolifératif
SOCS : suppressor of cytokine signaling
SOS : son of sevenless
STAT : signal transducer and activator of transcription
Src : sarcoma
TE : thrombocythémie essentielle
TGF : tumor growth factor
TIMP-1 : tissue inhibitor of metalloproteinases 1
TNF : tumor necrosis factor
Tpo : thrombopoïétine
TPS : thrombose porte splanchnique
TRAIL-R : TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor
VEGF : vascular endothelial growth factor
VGT : volume globulaire total

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1: HÉMATOPOÏÈSE (ISSUE DU SITE WEB : CONTANATURA.WEBLOG.COM.PT/ARQUIVO/STEM-CELL.JPG) LT-HSC : LONG TERM HEMATOPOIETIC STEM CELL ; ST-HSC : SHORT TERM HEMATOPOIETIC STEM CELL ; MPP : MULTIPOTENT PROGENITOR ; CMP : COMMITTED MYELOID PROGENITOR ; CLP : COMMITTED LYMPHOID PROGENITOR ; MEP : MEGACARYOCYTIC ERYTHROID PROGENITOR ; GMP : GRANULOCYTIC-MONOCYTIC PROGENITOR.....	11
FIGURE 2 : HEMATOPOÏÈSE ET CYTOKINES	11
FIGURE 3: SCHEMA DU RECEPTEUR DE L'EPO ET DES SITES DE LIAISON POUR LES PROTEINES DE LA SIGNALISATION (LACOMBE ET AL. HAEMATOLOGICA, 1998).....	15
FIGURE 4 : STRUCTURE DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE IL-6 (BAUER, KERR ET AL. 2007).....	26
FIGURE 5: SCHEMA RECAPITULATIF DES CYTOKINES HEMATOPOÏËTIQUES ACTIVANT JAK2	30
FIGURE 6: SIGNALISATION DE L'EPOR (CHONG, KANG ET AL. 2002).....	33
FIGURE 7 : STRUCTURE DE C-KIT (ROSKOSKI 2005)	35
FIGURE 8: COMPLEXE SCF/C-KIT ET SIGNALISATION (BENSON 2008).....	35
FIGURE 9 : SIGNALISATION PAR LE COMPLEXE G-CSF/G-CSFR (PANOPOULOS AND WATOWICH 2008).....	37
FIGURE 10 : SIGNALISATION TPO/C-MPL (SITE WEB BIOCARTA).....	40
FIGURE 11 : SIGNALISATION INDUITE PAR LE COMPLEXE IL-6/IL-6R α /GP130 (SITE WEB BIOCARTA).....	42
FIGURE 12 : SIGNALISATION IL-11/IL-11R α /GP130 D'APRES (DU AND WILLIAMS 1997; HEINRICH, BEHRMANN ET AL. 1998; MAHBOUBI, BIEDERMANN ET AL. 2000; HEINRICH, BEHRMANN ET AL. 2003)	44
FIGURE 13 : STRUCTURE DE LA GP130 D'APRES (TIMMERMANN, PFLANZ ET AL. 2000).....	46
FIGURE 14 : SIGNALISATION IL-8/CXCR1 ET CXCR2 D'APRES (HERMOUET, CORRE ET AL. 2000)LEUKEMIA AND LYMPHOMA, 2000.	48
FIGURE 15 : STRUCTURE DE JAK2 ET LOCALISATION DE LA MUTATION V617F	54
FIGURE 16 : MECANISME DE PERTE D'HETEROZYGOTIE PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE (KRALOVICS, PASSAMONTI ET AL. 2005).	54
FIGURE 17: SIDEROBLASTES EN COURONNE (PHOTO DONNEE PAR LE DR RICHARD GARAND).....	67
FIGURE 18: SCHEMA DES SITES DE THROMBOSES HEPATIQUES PROFONDES.	72
FIGURE 19: MODELE DE PRODUCTION DE CYTOKINES ET VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS L'HEMATOPOÏÈSE ANORMALE DANS LA PV	141
TABLEAU 1 : CRITERES DE DIAGNOSTIC DES SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS. MISE A JOUR 2008 PAR L'ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE.	20

RÉSUMÉ

JAK2, cytokines et récepteurs dans la Polyglobulie de Vaquez.

La polyglobulie de Vaquez (PV) appartient à la famille des syndromes myéloprolifératifs (SMP). C'est une maladie clonale dont l'origine se situe au niveau d'un progéniteur multipotent. En 2005, la description de la mutation JAK2V617F et sa présence dans 95% des cas de PV, à la fois à l'état homozygote et hétérozygote, a été le point de départ de nouvelles interrogations concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de cette maladie. L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, de mettre au point une technique sensible de PCR quantitative spécifique d'allèle. Cette technique a permis d'étudier le niveau d'expression de JAK2V617F chez les patients au diagnostic de SMP. Nous avons, ensuite, utilisé cette même approche pour étudier l'importance de la détection de JAK2V617F pour la détection de SMP latent dans les présentations atypiques comme les thromboses digestives profondes et les anémies réfractaires sidéroblastiques. Nous avons également, en collaboration, déterminé que quand un SMP positif pour JAK2V617F se transforme en leucémie aigue myéloïde, celle-ci est fréquemment négative pour la mutation. Il a également été mis en évidence que les clones JAK2V617F positifs et négatifs peuvent se développer à partir d'un ancêtre commun. Enfin, nous avons décrit dans la PV, la dérégulation de la production, au niveau protéique et ARN messenger, de plusieurs cytokines hématopoïétiques et de leur voie de signalisation (IL-11, IL-6, gp130, JAK2, STAT3). Cette dérégulation participe à l'hématopoïèse anormale dans la PV. Ces mécanismes, indépendants de JAK2V617F, semblent maintenir l'équilibre entre les voies JAK2V617F/STAT5 et JAK2/STAT3.

ABSTRACT

JAK2, cytokines and receptors in Polycythemia Vera

Polycythemia Vera (PV) belongs to the family of myeloproliferative disorders (MPD). It is a clonal disease arising from a multipotent progenitor. In 2005, the JAK2V617F mutation was discovered as a MPD specific mutation present in more than 95% of PV patients both at homozygous and heterozygous state. This discovery was the starting point of a new area in the understanding of molecular mechanisms involved in MPD pathogenesis. The aim of our work was, first to set up an assay of allele specific quantitative PCR. Thanks to this assay, we were able to study the importance of JAK2V617F mutation at diagnosis of MPD. We also used this assay to investigate the relevance of JAK2V617F detection for the diagnosis of latent MPD in atypical presentations like splanchnic vein thrombosis and refractory anemia with ringed sideroblasts. In addition, in collaboration, we have determined that positive JAK2V617F MPD often transform into JAK2V617F negative acute myeloid leukemia, and that both clones may derive from the same JAK2V617F negative ancestral clone. Finally, we have described , in PV patients, elevated production of hematopoietic cytokines (IL-11, IL-6), both at the protein and messenger RNA level. Their signaling pathway (gp130, JAK2, STAT3) was also dysregulated and this pathway is involved in PV abnormal hematopoiesis. This mechanism is independent from JAK2V617F and seems to maintain the balance between the JAK2V617F/STAT5 and JAK2/STAT3 pathways.

INTRODUCTION

I. Hématopoïèse et syndromes myéloprolifératifs

Hématopoïèse généralités

L'hématopoïèse est le processus à l'origine de la fabrication de toutes les lignées de cellules sanguines. En se divisant, les cellules souches hématopoïétiques donnent de nouvelles cellules souches, ceci dans le but de garder un stock de cellules souches, et des cellules qui pourront se différencier en érythrocytes, leucocytes et plaquettes. Au stade embryonnaire, l'hématopoïèse s'effectue d'abord dans les îlots sanguins de la vésicule vitelline puis dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques. Après la naissance, l'hématopoïèse se déroule dans la moelle rouge des os plats : sternum, crêtes iliaques et tête du fémur.

On distingue plusieurs étapes dans la transformation des cellules souches en cellules matures circulant dans les vaisseaux sanguins. Les cellules souches se différencient en progéniteurs pluripotents qui eux-mêmes donneront lieu à trois processus de différenciation : l'érythropoïèse, la leucopoïèse comprenant la granulopoïèse, et la mégacaryopoïèse (Figure 1).

Les cytokines possèdent des actions variées au sein de l'organisme en fonction de l'organe et du type cellulaire qui les produisent et/ou qui expriment leurs récepteurs. Certaines d'entre elles sont particulièrement impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse. Par exemple, les Colony Stimulating Factor (CSF) (IL-11, IL-3, le Stem Cell Factor (SCF), Granulocyte-, Macrophage-, GM-CSF, érythropoïétine (Epo), thrombopoïétine (Tpo)) stimulent la pousse de colonies de cellules granuleuses et macrophagiques à partir de cellules mononucléées (CMN) de moelle osseuse. Ils agissent sur la survie, la prolifération, la différenciation et la maturation des cellules. On peut les classer en différentes catégories. Tout d'abord, les facteurs de compétence (SCF, IL-11, IL-6), capables d'agir en synergie avec d'autres facteurs (IL-3), ils permettent l'entrée en cycle des cellules souches quiescentes, passage de la phase G0 à la phase G1. Ensuite, viennent les facteurs multipotents comme l'IL-3 qui agit en synergie avec le SCF, le GM-CSF qui agit sur les granulocytes et les monocytes. Ces facteurs possèdent une chaîne β commune au niveau de leurs récepteurs, ne sont pas spécifiques de lignée, stimulent la prolifération des progéniteurs multipotents après leur entrée en cycle et sont nécessaires à la survie des cellules souches quiescentes. Enfin, les facteurs spécifiques de lignée (Epo : lignée érythroïde ; Tpo : lignée mégacaryocytaire ; M-CSF : lignée monocyttaire ; G-CSF : lignée granulocytaire), ces facteurs agissent tardivement et sont spécifiques d'une seule lignée (Figure 2). Il existe une grande redondance des cytokines hématopoïétiques.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (non compressé)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 1: Hématopoïèse (issue du site web : contanatura.weblog.com.pt/arquivo/stem-cell.jpg) LT-HSC : Long Term Hematopoietic Stem Cell ; ST-HSC : Short Term Hematopoietic Stem Cell ; MPP : Multipotent progenitor ; CMP : Committed Myeloid Progenitor ; CLP : Committed Lymphoid Progenitor ; MEP : Megacaryocytic Erythroid Progenitor ; GMP : Granulocytic-Monocytic Progenitor.

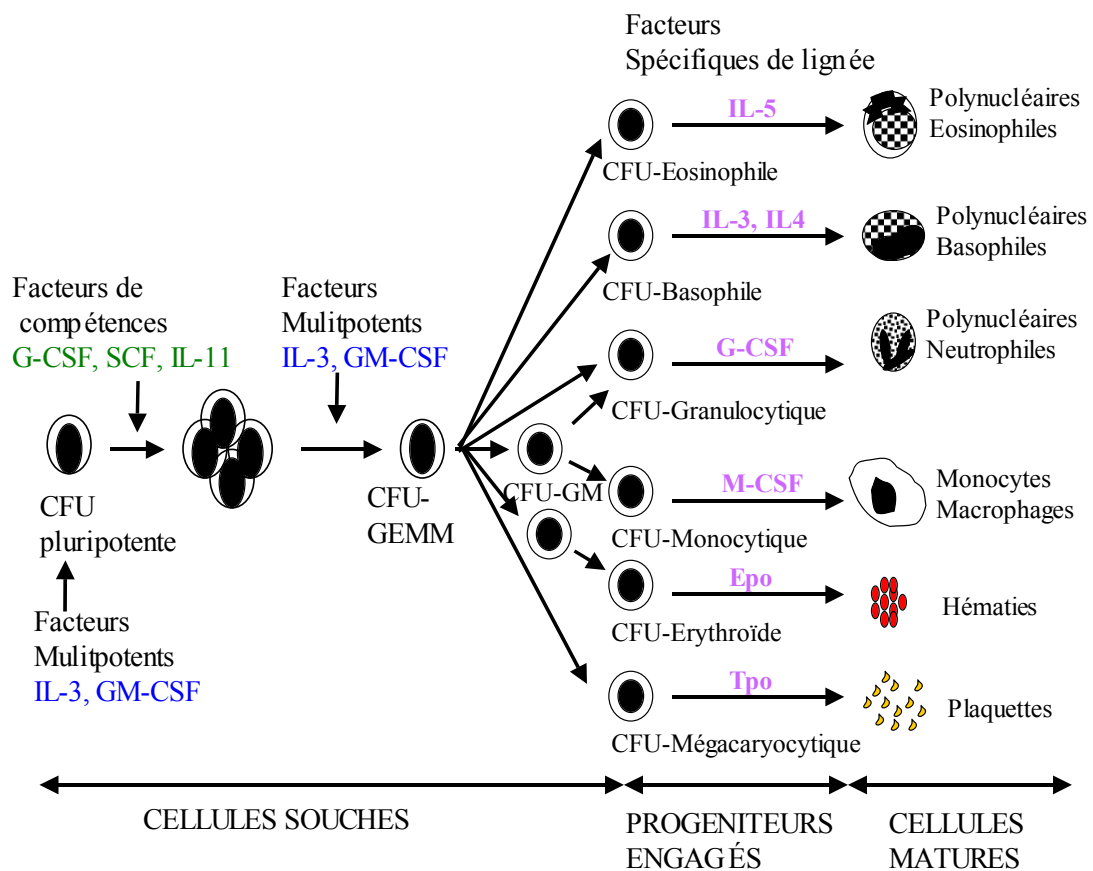


Figure 2 : Hématopoïèse et cytokines

Une cytokine peut avoir différentes actions sur un ou plusieurs types cellulaires, une même cellule peut répondre à plusieurs cytokines en même temps ou successivement et enfin, au sein d'une même lignée une cytokine peut avoir un effet différent selon le degré de différenciation d'une cellule.

Les chimokines des familles CC (Macrophage Inflammatory Protein 1 α (MIP 1 α)) et CXC (IL-8) sont également impliquées dans la régulation de l'hématopoïèse. MIP 1 α , par exemple, bloque les progéniteurs précoces en phase G1 du cycle cellulaire mais par ailleurs, stimule la prolifération et la différenciation des Colony Forming Unit (CFU)-GM et des CFU-E (progéniteurs engagés) en synergie avec les cytokines agissant sur les cellules CD34+. L'interleukine-8 est une chimiokine pro-inflammatoire produite par les progéniteurs hématopoïétiques normaux, les cellules du sang matures et les cellules leucémiques ; ces cellules expriment également les récepteurs de l'IL-8 ce qui permet une action autocrine. *In vitro*, l'IL-8 est également produite par les cellules stromales (fibroblastes, cellules épithéliales et endothéliales), les polynucléaires neutrophiles (PNN), les lymphocytes T et B, les monocytes et les macrophages. L'IL-8 est impliquée dans l'attraction des neutrophiles et aussi dans la mobilisation et la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques. En association avec le Platelet Factor-4 (PF-4), l'IL-8 stimule la survie des progéniteurs hématopoïétiques. En association avec le M-CSF, elle stimule la prolifération des progéniteurs et la différenciation des monocytes (Corre, Pineau et al. 1999; Hermouet, Corre et al. 2000).

Il existe des facteurs inhibiteurs de l'hématopoïèse comme le Tumor Necrosis Factor α (TNF α), le Tumor Growth Factor β (TGF β) ou les Interférons (IFN). Ils ne sont pas spécifiques de lignée et affectent à la fois les progéniteurs précoces, et tardifs. Le TGF β , MIP 1 α et l'IFN γ bloquent les cellules souches en phase G1 et agissent donc contre les cytokines d'action précoce.

Les facteurs de transcription sont également impliqués dans l'hématopoïèse normale et appartiennent principalement à deux grandes catégories. Les gènes Homéobox (Hox) B3 et B6 sont impliqués dans l'hématopoïèse précoce, Hox B3 dans la formation des CFU-GM et des Burst Forming Unit (BFU) Erythroïdes et Hox B6 dans la production de polynucléaires neutrophiles et la maturation des monocytes et des macrophages; et les facteurs de transcription GATA-1 et GATA-2 qui sont essentiels dans l'érythropoïèse et la sensibilisation des cellules souches à l'action du SCF.

Les cytokines hématopoïétiques sont produites par de nombreux types cellulaires: les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages, les ostéoblastes, des cellules du foie (Tpo) et du rein (Epo) et les lymphocytes T. Les progéniteurs hématopoïétiques sont eux aussi source de cytokines. Les progéniteurs CD34+ produisent un grand nombre de facteurs parmi lesquels on retrouve d'une part, le SCF, FLT-3, et la thrombopoïétine qui stimulent leur prolifération et les protègent de l'apoptose en présence d'Insulin-like Growth Factor 1 (IGF 1) et d'autre part les TGFβ 1 et 2 et le PF-4 qui inhibent la prolifération des progéniteurs CD34+. Ils produisent également le basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF), le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), l'HGF et l'IL-8, impliqués dans la stimulation et l'attraction des cellules endothéliales. Ils sécrètent aussi MIP 1α et β, RANTES, IL-8 et PF-4 qui ont un rôle dans l'attraction des autres cellules, la stimulation de l'angiogénèse, la régulation, la migration et l'adhésion cellulaire (Ratajczak, Kijowski et al. 2003). La production de TGFβ 1 et de VEGF, par les progéniteurs CD34+, augmente pendant la différenciation érythroïde. Le VEGF prépare et aide à la migration des réticulocytes vers les vaisseaux sanguins. Le VEGF est également produit par les mégacaryocytes, il a alors un rôle dans la migration de ces cellules et la formation des plaquettes. Le b-FGF est produit par les cellules stromales, les lymphocytes, les monocytes, les macrophages, les polynucléaires neutrophiles surtout par les mégacaryocytes et les plaquettes. Les récepteurs du b-FGF possèdent une activité tyrosine kinase. Le b-FGF peut agir sur l'hématopoïèse par synergie avec l'IL-3, le GM-CSF ou le SCF mais aussi en stimulant la production d'IL-11 et de M-CSF par les cellules stromales (action autocrine). Les cellules du micro-environnement médullaire (fibroblastes, adipocytes, cellules endothéliales vasculaires et macrophages) produisent également des cytokines impliquées dans le maintien des niches hématopoïétiques et dans l'hématopoïèse comme l'IL-11: un facteur de compétence impliqué dans l'hématopoïèse précoce et l'hépatocyte growth factor (HGF). Les cellules stromales produisent de l'HGF de façon constitutive et expriment son récepteur c-Met (Takai, Hara et al. 1997).

Ainsi, la régulation de l'hématopoïèse est un ensemble de mécanismes complexes qui met en jeu différentes cytokines et facteurs de croissance mais aussi de nombreux types cellulaires (progéniteurs précoces et engagés ; cellules du stroma). La moindre anomalie intervenant dans cet enchaînement d'événements entraîne une perturbation en cascade des éléments en aval. Nous allons voir dans le chapitre suivant quelles sont les anomalies de production de cytokines hématopoïétiques identifiées à ce jour dans les syndromes myéloprolifératifs, et leur possible implication dans la pathogenèse de ces maladies.

Erythropoïèse

L'érythropoïèse désigne les différentes étapes de la fabrication des globules rouges. L'érythropoïèse débute par une cellule souche multipotente de la moelle osseuse (CFU: colony forming unit) et aboutit à des millions de cellules matures (production de 2 500 000 hématies par seconde). Avant d'atteindre le stade final d'érythrocyte, la différenciation de la cellule souche passe par les nombreux stades intermédiaires suivants : proérythroblaste, érythroblaste basophile, érythroblaste polychromatophile, érythroblaste acidophile, dernier stade avant l'érythrocyte, réticulocyte. Le réticulocyte possède encore des ribosomes et des mitochondries, ce qui lui permet de synthétiser activement l'hémoglobine. Le réticulocyte devient un érythrocyte mature après éjection du noyau.

Erythropoïétine

L'érythropoïétine (Epo) est la principale cytokine responsable de la différenciation érythroïde. C'est une hormone glycolipidique produite par les cellules fibroblastiques du cortex rénal chez l'adulte et par le foie fœtal chez l'embryon. Elle exerce son action sur les progéniteurs médullaires de façon paracrine. L'Epo est essentielle à la survie, à la prolifération et à la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Zwezdaryk, Coffelt et al. 2007).

L'expression de l'Epo est régulée par l'hypoxie, c'est également le cas d'autres facteurs hématopoïétiques comme l'Hepatocytes Growth Factor (HGF). En effet, le gène de l'Epo contient un site de liaison pour l'Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF1 α). L'HIF est un complexe transcriptionnel composé de deux sous-unités : alpha et bêta. En condition de normoxie, les deux sous unités sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome. Par contre, en condition d'hypoxie, HIF1 α n'est pas ciblée pour la dégradation par le protéasome. Il peut donc se fixer sur le gène de l'Epo et ainsi permettre une augmentation de la synthèse d'ARN messenger et donc d'Epo (Lacombe and Mayeux 1998).

L'érythropoïétine agit par liaison avec son récepteur (EpoR). L'EpoR appartient à la famille des récepteurs de cytokines de classe 1 (Figure 3).

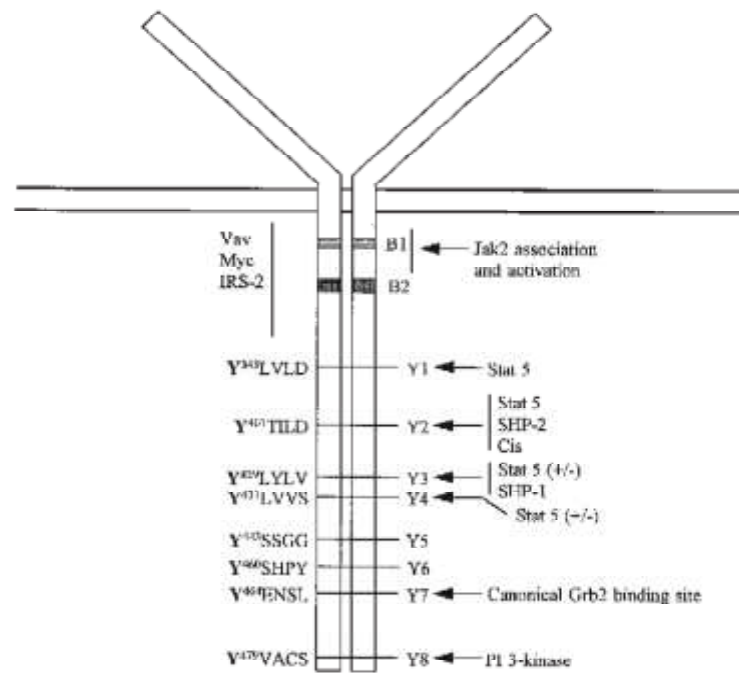


Figure 3: Schéma du récepteur de l'Epo et des sites de liaison pour les protéines de la signalisation (Lacombe et al. Haematologica, 1998)

Ce dernier est exprimé par les progéniteurs érythroïdes (récepteur de haute affinité) mais aussi par les cellules souches mésenchymateuses sur lesquelles l'Epo possède un effet pro-angiogénique en réponse à l'hypoxie en synergie avec le b-FGF et le VEGF. L'Epo augmente le chimiotactisme, la migration des cellules mésenchymateuses. Elle participe ainsi à la production de nouveaux vaisseaux sanguins, en plus de son action sur la production d'érythrocytes (Ribatti, Presta et al. 1999).

D'autres organes et types cellulaires non hématopoïétiques, comme le cerveau, les cellules endothéliales et les myocardiocytes, expriment l'EpoR dans les conditions physiologiques et peuvent donc répondre à l'Epo. Dans ce cas, l'Epo agit de façon paracrine comme facteur de réponse au stress causé par exemple par l'hypoxie ou le glutamate qui est neurotoxique. L'Epo possède alors une action anti-apoptotique via l'activation de Bcl-xL (Jelkmann, Bohlius et al. 2008).

Le détail de la signalisation par l'EpoR est donné plus loin, dans le paragraphe « Cytokines et récepteurs liés à JAK2 ».

Syndromes myéloprolifératifs

i. Description générale

La première description de ces pathologies hématologiques a été faite par William Dameshek en 1951 (Dameshek 1951). Les SMP sont caractérisés par l'hyperprolifération d'une ou plusieurs lignées hématopoïétiques à partir d'un progéniteur multipotent. Le progéniteur anormal ne remplace pas entièrement les cellules saines, cependant, sa descendance peut prendre une telle place dans le sang périphérique qu'une clonalité quasi complète est observée. Les principales pathologies regroupées dans les SMP sont la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC), la Polyglobulie de Vaquez (PV), la Thrombocythémie Essentielle (TE) et la Myélofibrose Primitive (MFP). La Leucémie Myéloïde Chronique se distingue des autres SMP par la présence d'une translocation tr 9-22, appelée chromosome de Philadelphie (Phi), résultant en la protéine de fusion BCR-ABL, ce qui la place à part des autres SMP. La Polyglobulie de Vaquez, la Thrombocythémie Essentielle et la Myélofibrose idiopathique sont désignées SMP Phi- (négatifs pour le chromosome de Philadelphie). En 2005, plusieurs groupes ont mis en évidence la présence de la mutation V617F de la tyrosine kinase JAK2. Cette mutation est retrouvée dans environ 90% des PV, 50% des MFP et 70% des TE (Baxter, Scott et al.; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005). Plus récemment d'autres mutations au niveau de l'exon 12 de

JAK2 on été décrites (Scott, Tong et al. 2007). Le pronostic le plus favorable est celui de la TE, le plus mauvais est celui de la MFP. La TE peut évoluer en PV, ces deux pathologies peuvent également évoluer en myélofibrose. Enfin, chacun de ces trois syndromes myéloprolifératifs peut se transformer en leucémie aigue myéloïde.

ii. La Polyglobulie de Vaquez

a) Description

La Polyglobulie de Vaquez (PV) est le premier des SMP a avoir été reconnu comme une entité clinique. Hyprocrate avait déjà décrit quelques cas, mais c'est Luis Henri Vaquez, en 1892 qui publia le premier une description détaillée d'un patient dont il nomma la pathologie « cyanose avec hyperglobulie persistante » (Vaquez 1892; Skoda 2007). Plus tard, William Osler rapporta quatre autres cas de patients souffrant de « vraie polyglobulie », en opposition avec les polyglobulies dues à l'hémoconstriction (Osler 1903; Osler 1908). Depuis, les progrès réalisés en biologie moléculaire ont permis de mieux caractériser la PV. La PV est une maladie clonale, acquise, caractérisée par une augmentation de la prolifération de la lignée érythrocytaire principalement mais également des lignées granulocytaires et mégacaryocytaire. La PV se différencie des polyglobulies dites secondaires ou réactionnelles par l'absence d'hypoxie ou d'hyperproduction d'érythropoïétine (cardiaque ou respiratoire). Le diagnostic de la PV se fait sur des critères majeurs et mineurs dont le détail et présenté dans le Tableau 1. Globalement, ils comprennent l'élévation de l'hématocrite et de l'hémoglobine, la présence de la mutation JAK2V617F ou d'autres mutations de JAK2 (exon 12), un taux d'érythropoïétine sérique normal ou bas et enfin, une pousse endogène des progéniteurs en culture *in vitro* en l'absence de cytokines. Les patients atteints de PV sont généralement âgés (>60 ans). De nombreux progéniteurs hématopoïétiques CD34+ sont présents dans le sang des patients, ce qui indique un changement de compartiment des cellules souches de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Ce phénomène conduit à une installation des progéniteurs dans la rate et ainsi à une splénomégalie.

b) Présentation clinique de la Polyglobulie de Vaquez

Les critères diagnostics des SMP sont définis par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Tableau 1) et du Polycythemia Vera Study Group (PVSG). La formule sanguine

présente un taux d'hémoglobine élevé (> 16 g/l chez la femme et > 18 g/l chez l'homme), un hématocrite élevé ($>49\%$ chez la femme et $>53\%$ chez l'homme) malgré un taux d'érythropoïétine sérique bas (< 3 U/L), une augmentation du volume globulaire total (VGT) et du chiffre de leucocytes et de plaquettes ($>400\ 000/\text{mm}^3$). La présence de la mutation V617F de JAK2 découverte en 2005 (Baxter, Scott et al.; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005) et les mutations de l'exon 12 de JAK2 font maintenant partie des critères majeurs de diagnostic de la PV (Scott, Tong et al. 2007). Dans certains cas, les patients développent une splénomégalie résultant d'une hématopoïèse extramédullaire, l'apparition d'un prurit est également courante. Les complications les plus fréquentes sont des thromboses, des hémorragies et dans moins de 10% des cas, on observe une transformation en leucémie aigue myéloïde principalement de types M2 (myélocytaire), M6 (érythroblastique) et M7 (mégacaryocytaire).

iii. Thrombocythémie Essentielle

Les patients atteints de thrombocythémie essentielle (TE) présentent un taux de plaquettes très élevé ($>450 \times 10^9/\text{L}$) souvent accompagné d'une élévation du taux de granulocytes. Les mégacaryocytes sont géants et ont des lobulations de noyaux atypiques. Le diagnostic de la TE est basé essentiellement sur des critères d'exclusion. Exclusion, tout d'abord, des critères des autres SMP (PV et MFP), et exclusion des causes de thrombocytose réactionnelle (Tableau 1). Les critères d'inclusion sont donc l'élévation du taux de plaquettes, la présence de la mutation JAK2V617F ou d'un autre marqueur clonal, prolifération de mégacaryocytes matures (Tableau 1). Les patients atteints de TE sont généralement des adultes mais on trouve aussi des cas de TE chez les enfants. Les complications courantes sont des accidents thrombotiques.

iv. Myélofibrose Primitive

La myélofibrose primitive (MFP) se caractérise par une fibrose importante de la moelle osseuse avec disparition des niches hématopoïétiques, une érythromyélie à dacryocytes et une hématopoïèse extramédullaire avec splénomégalie. La présence de cette pathologie est caractérisée par un défaut de l'érythropoïèse avec une réaction de la moelle osseuse dès les premiers stades de la maladie associée à une augmentation de l'expression de cytokines pro-fibrotiques et pro-angiogéniques comme le TGF- β , le PDGF, le TNF α , le bFGF

et le VEGF produits par les mégacaryocytes pathologiques et les plaquettes (Martyré, Le Bousse-Kerdiles et al. 1997; Le Bousse-Kerdiles and Martyre 1999; Musolino, Calabro et al. 2002; Xu, Bruno et al. 2005). On observe une augmentation des progéniteurs circulants (CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E et CFU-MK), leur prolifération est clonale, la myélofibrose est donc un phénomène réactionnel dû à l'activation des fibroblastes par les cytokines produites par les mégacaryocytes et les plaquettes et à une augmentation du réseau de réticuline.

v. Traitements des syndromes myéloprolifératifs

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont donc associés à des risques variables d'accidents vasculaires et à un risque de transformation en leucémie aigue myéloïde, ou d'évolution à long terme vers la myélofibrose, de mauvais pronostic.

Dans le cadre de la PV, suite à l'établissement du diagnostic, les patients doivent être stabilisés par phlébotomies (prélèvement de 300 ml de sang environ). Cette pratique a pour but de faire baisser l'hématocrite (<42% pour les femmes et <45% pour les hommes). Chez les patients présentant un taux de plaquette élevé, la phlébotomie peut être associée à de faibles doses d'aspirine permettant ainsi de diminuer les risques de thrombose. En cas d'échec et chez les patients les plus jeunes (<40 ans), le traitement est complété par de l'hydroxyurée (Hydréa). En cas d'intolérance à l'hydroxyurée, on utilise le pipobroman.

Le traitement de la TE consiste en la prévention des accidents vasculaires tout en minimisant les effets secondaires possibles des médicaments. Les principaux facteurs de risques de thrombose sont l'âge (60 ans et plus) et la présence d'antécédent d'accident thrombotique. D'autres critères peuvent également entrer en compte comme le tabagisme et l'obésité. Ces patients sont traités par l'hydroxyurée. Les patients à risque présentant une intolérance à l'hydroxyurée peuvent recevoir de l'anagrélide, une molécule spécifique des mégacaryocytes et non leucémogène, ou dans de rares cas de l'IFN- α . L'administration de faibles doses d'aspirine permet de diminuer les risques d'accidents thrombotiques chez les patients plus jeunes et ne présentant pas de facteurs de risque de thrombose (Solberg 2002).

La seule thérapie curative consiste en la greffe de cellules souches allogéniques. Cette thérapie peut être requise pour les patients atteints de myélofibrose primitive (MFP) et dans les cas de myélofibrose post-PV et post- thrombocythémie essentielle (TE). Elle est toujours

Critère diagnostique OMS 2008			
	Polyglobulie de Vaquez	Thrombocythémie Essentielle	Myélofibrose Primitive
Critère Majeur	1- Hgb > 18,5 g.dl ⁻¹ (homme) > 16,5 g.dl ⁻¹ (femme) ou Hgb ou Hct >99% de la gamme de référence age, sexe ou altitude de résidence ou Hgb > 17g.dl ⁻¹ (homme) ou >15g.dl ⁻¹ (femme) si associé à une augmentation soutenue ≥2g.dl ⁻¹ de la valeur basale ne pouvant être attribué à une correction de la déficience en fer ou Masse globulaire élevée >25% au dessus de la moyenne normale attendue	1- Plaquettes ≥450*10 ⁹ l ⁻¹	1- Prolifération mégacaryocytes accompagnée à la fois par une fibrose à réticuline et/ou collagène ou en l'absence de fibrose à réticuline, les changements des mégacaryocytes doivent être accompagnés d'une augmentation de la cellularité médullaire, d'une prolifération granulocytaire et souvent d'une diminution de l'érythropoïèse (i.e. MFP pré-fibrotique)
	2- Présence de JAK2V617F ou mutations similaires	2- Prolifération des Mégakaryocytes matures. Pas ou peu de prolifération des granulocytaire ou érythroïde	2- Pas de correspondance avec les critères OMS pour la LMC, PV, MFP, SMD ou autre néoplasme myéloïde
		3- Pas de correspondance avec les critères OMS pour la LMC, PV, MFP, SMD ou autre néoplasme myéloïde	3- Présence de JAK2V617F ou autre marqueur clonal ou pas de preuves de no fibrose médullaire réactionnelle.
		4- Présence de JAK2V617F ou autre marqueur clonal ou pas de preuves de thrombocytose réactionnelle	
Critères Mineurs	1- Prolifération des trois lignées dans la moëlle osseuse		1- Leukoerythroblastoses
	2- Taux d'Epo sérique inférieur à la normale		2- Taux sérique de LDH augmenté
	3- Pousse des CEE		3- Anémie
			4- Splénomégalie palpable

Tableau 1 : Critères de diagnostic des syndromes myéloprolifératifs. Mise à jour 2008 par l'Organisation Mondiale de la Santé.

associée aux thérapies de palliatives citées précédemment dans le cadre de la gestion des risques vasculaires. Elle est peu utilisée chez les patients atteints de PV et de TE étant donné l'âge des patients et le bon pronostic global de ces pathologies.

L'interféron alpha pégylé (IFN- α peg) pourrait être considéré comme un nouveau traitement potentiel des cas réfractaires à l'hydroxyurée et au pipobroman. Ses effets sont étudiés au stade expérimental dans des cas particuliers de patients non répondeurs aux traitements classiques. L'IFN- α peg semble agir sur le clone porteur de la mutation JAK2-V617F et contribuer à la disparition de ce dernier. Cependant c'est un traitement très coûteux et l'IFN- α peg n'est pas toujours bien toléré par les patients en raison du large spectre d'action de l'IFN- α (Kiladjian, Cassinat et al. 2006).

De nouvelles approches sont actuellement en cours de développement. Dans le cas des myélofibroses primitives ou post-PV ou TE, le groupe des agents immunomodulateurs comme le thalidomide, ou le lénalidomide en association avec la prednisone montre des résultats encourageants sur les caractéristiques biologiques des patients mais ne semble pas agir sur la moelle osseuse ni sur les anomalies de caryotype. Parmi les autres thérapies en développement, on trouve les agents ciblant la tyrosine kinase JAK2 sauvage et mutée. L'un d'eux, le CEP-701 est en cours d'essai clinique (Hexner, Serdikoff et al. 2007).

Présentations atypiques des syndromes myéloprolifératifs

i. Thromboses digestives profondes

Les thromboses portes se caractérisent par l'obstruction et l'occlusion des veines hépatiques et/ou de la portion supra-hépatique de la veine cave inférieure (syndrome de Budd-Chiari). La présentation clinique dépend de la vitesse et de l'étendue de l'occlusion. Classiquement, le syndrome se manifeste par une hépatosplénomégalie, des signes d'hypertension portale, et parfois une dégradation des fonctions du foie. Ces syndromes représentent une complication typique, bien que rare, des syndromes myéloprolifératifs. Dans certains cas, le syndrome de Budd-Chiari apparaît non pas comme une complication, mais comme l'un des premiers signes de syndrome myéloprolifératif (Breccia, Morano et al. 2005). Nous verrons dans la partie « Résultats » que la détection de la mutation JAK2V617F permet le diagnostic d'un SMP latent chez les patients atteints de syndrome de Budd-Chiari.

II. Cytokines et récepteurs liés à JAK2

Les cytokines

i. Description générale

Les cytokines sont des glycoprotéines à quatre hélices α solubles ou membranaires de faible poids moléculaire. Les cytokines sont impliquées dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (prolifération, différenciation, apoptose, réponse inflammatoire...). Leur action peut être paracrine et/ou autocrine, c'est pourquoi les cytokines sont actives à de très faibles concentrations. Les cytokines sont rarement produites de manière constitutive, mais, le plus souvent en réponse à une activation cellulaire d'origine variée : stress cellulaire, cascade de cytokines.... Les cytokines sont capables de réguler positivement ou négativement la production des autres cytokines, et parfois même leur propre production.

L'érythropoïétine a été décrite précédemment dans le chapitre sur l'érythropoïèse, elle ne sera donc pas citée dans ce chapitre.

ii. Le stem cell factor : SCF

Le stem cell factor (SCF) est un facteur de croissance hématopoïétique qui exerce son activité via son récepteur c-Kit. La signalisation induite par le complexe SCF/c-Kit est essentielle à la survie, à la prolifération et à la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Le SCF existe à la fois sous forme soluble et sous forme membranaire. La forme soluble est obtenue par épissage alternatif et par clivage protéolytique (Anderson, Lyman et al. 1990; Roskoski 2005). Les deux formes contiennent initialement un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un composant intracellulaire. La forme soluble est obtenue à partir de l'isoforme 1. L'enzyme responsable du clivage permettant l'obtention de la forme soluble semble être la Métalloprotéase de la matrice 9 (MMP-9). La forme membranaire est issue de l'isoforme 2 dont l'exon 6 a été clivé au moment de l'épissage. L'isoforme 2 ne contient pas de site de clivage par la MMP-9 et reste donc ancré à la membrane. Sous forme soluble, le SCF se présente comme un dimère non covalent. Il va donc induire le recrutement de deux récepteurs c-Kit.

Le SCF est largement exprimé durant l'embryogénèse. Il est détectable dans le cerveau, l'endothélium, les gamètes, le cœur, les reins, les poumons, les mélanocytes, la peau, mais aussi au niveau des cellules stromales de la moelle osseuse, du foie et du thymus.

Le SCF agit en synergie avec d'autres facteurs de croissance hématopoïétiques comme le GM-CSF, l'interleukine 3 et l'érythropoïétine (Roskoski 2005).

iii. Le Granulocyte Colony Stimulating Factor : G-CSF

Le facteur stimulant des granulocytes (G-CSF) est la principale cytokine responsable de la régulation de la prolifération et de la différenciation terminale des neutrophiles. Le G-CSF a d'ailleurs été découvert grâce à sa capacité à stimuler la pousse de colonies neutrophiles, *in vitro*, à partir de progéniteurs hématopoïétiques humains.

Le G-CSF est produit par de nombreux types cellulaires : les fibroblastes, les cellules endothéliales, les monocytes, les macrophages et les cellules stromales de la moelle osseuse. Chez les personnes saines, le taux de G-CSF sérique est bas (de < 30 à 163 pg/ml).

Durant l'hématopoïèse, la réponse des progéniteurs au G-CSF entraîne une diminution de la durée du cycle cellulaire ayant pour conséquence une augmentation de la prolifération. Le G-CSF possède également un rôle de promoteur de la survie des cellules de la lignée granuleuse. Par ailleurs, le G-CSF est impliqué dans l'augmentation du nombre de neutrophiles circulants. Il agit en diminuant le temps de transit vers la circulation périphérique des neutrophiles récemment produits. Le G-CSF stimule aussi la migration des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse vers le sang.

La production de G-CSF est stimulée par des acteurs de l'inflammation comme l'interleukine 1 β , le TNF α et le lipopolysaccharide. Le gène du G-CSF est régulé à la fois de façon transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Son promoteur possède des sites de réponse au Nuclear Factor κ B (NF κ B) p65 et au Nuclear Factor-IL-6/C/EBP β qui sont des facteurs de transcription impliqués dans les réponses inflammatoire et de stress. Le gène du G-CSF peut également être régulé par la voie des p38 Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) (Panopoulos and Watowich 2008).

Le G-CSF est utilisé en clinique dans le traitement des neutropénies induites soit par les chimiothérapies, soit par des désordres congénitaux sévères (Bonilla, Gillio et al. 1989; Jakubowski, Souza et al. 1989; Dale, Bonilla et al. 1993).

iv. La thrombopoïétine : Tpo

L'existence de la thrombopoïétine (Tpo) a été évoquée pour la première fois en 1958. Elle doit son nom à son effet stimulant sur la mégacaryopoïèse et dans la production des plaquettes (Kelemen, Cserhati et al. 1958). Ce n'est pourtant qu'en 1994 qu'une preuve évidente de l'existence de cette molécule a été fournie par l'isolation et le clonage de la Tpo simultanément par cinq groupes de recherche indépendants (Bartley, Bogenberger et al. 1994; de Sauvage, Hass et al. 1994; Kuter and Rosenberg 1994; Lok, Kaushansky et al. 1994; Kato, Ogami et al. 1995). La Tpo est le facteur principal de la mégacaryopoïèse depuis la formation des colonies de mégacaryocytes à la production des plaquettes. Elle joue également un rôle important dans la différenciation et la prolifération des progéniteurs de plusieurs lignées hématopoïétiques.

La thrombopoïétine humaine est une protéine fortement glycosylée comprenant deux domaines distincts. Tout d'abord, une région N-terminale, composée de 153-résidus, homologue de l'Epo humaine avec laquelle elle partage 23% de sa séquence. Cette partie est suffisante pour la liaison au récepteur (c-Mpl) et la transduction du signal. Puis, on trouve le domaine C-terminal, composé de 179- résidus. Cette région contient de nombreuses prolines et glycines et six sites de N-glycosylation. La fonction de ce domaine est peu connue, cependant, certains travaux indiquent un rôle potentiel dans la sécrétion et la protection contre la protéolyse (Feese, Tamada et al. 2004).

La thrombopoïétine est produite par le foie. Elle régule le développement des mégacaryocytes en synergie avec d'autres cytokines telles que l'IL-6, l'IL-11, le leukemia inhibitory factor (LIF), le ciliary neurotrophic factor (CNTF) et l'oncostatine M (OSM). La Tpo et l'IL-6 agissent en synergie pour protéger les progéniteurs CD34⁺ et les mégacaryocytes contre l'apoptose via l'activation de Bcl-xL.

v. L'interleukine 6

Les cytokines de la famille IL-6 comprennent l'IL-11, le LIF, l'OSM, le CNTF et la Cardiotrophine 1. Ces cytokines partagent une chaîne transductrice, la gp130, responsable des rôles potentiellement redondant de ces cytokines. Les différences entre les cytokines de cette famille se fait via leur chaîne réceptrice spécifique : IL-6R α , IL-11R α , LIFR, OSMR,CNTFR.

L'interleukine 6 (IL-6) est une cytokine multifonctionnelle. C'est une molécule composée de 184 résidus contenant deux sites de glycosylation dans sa partie N-terminale et quatre résidus cystéines très conservés chez l'homme et la souris. Ces quatre cystéines sont également conservées chez le G-CSF, suggérant une structure tertiaire proche et des activités biologiques communes entre les deux cytokines. De plus, les deux gènes possèdent le même nombre d'exons et d'introns, et la taille des exons est très similaire indiquant que les deux gènes (G-CSF et IL-6 dériveraient d'un ancêtre commun (Kishimoto 1989).

L'IL-6 joue un rôle important dans la défense de l'hôte en participant à la régulation des réponses immunitaire et inflammatoire. Elle est produite par les lymphocytes T, les monocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, et les kératinocytes. On la retrouve également produite par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules stromales de la moelle osseuse et les cellules mésenchymales. La famille des cytokines de type IL-6 est impliquée dans la régulation de la phase aiguë de la réponse aux infections et aux blessures : action pro- ou anti-inflammatoire. Les membres de cette famille sont également fortement impliqués dans l'hématopoïèse, la régénération neuronale et celle du foie, le développement de l'embryon et la fertilité.

L'IL-6 possède des fonctions variées. Elle stimule la différenciation des cellules B et la production d'anticorps. Elle agit en synergie avec l'IL-3 dans le développement des mégacaryocytes et la production des plaquettes. L'IL-6 active la prolifération des cellules souches hématopoïétiques en stimulant leur entrée en phase G1 du cycle cellulaire. Elle induit également l'expression hépatique des protéines de la phase aiguë et régule le métabolisme osseux.

L'IL-6 exerce son rôle en se liant tout d'abord à son récepteur spécifique : l'IL-6R α , cette chaîne α ne possède pas de domaine intracellulaire, elle ne permet donc pas de transduction du signal. Le complexe IL-6/IL-6R α va ensuite recruté une molécule de glycoprotéine 130 (gp130) qui constitue la chaîne de transduction de signal commune à tous les membres de la famille IL-6 (Figure 4). Le complexe final est un hexamère formé de deux molécules d'IL-6, d'IL-6R α et de gp130. Il existe, à l'état naturel, des formes solubles de l'IL-6R α et de la gp130 dans le sérum humain. Il semblerait que ces formes solubles servent non seulement de tampon permettant de moduler la réponse systémique de l'IL-6 circulante, mais soit aussi capable d'induire un signal par trans-signalisation pour des cellules n'exprimant que la gp130 (Heinrich, Behrmann et al. 2003).

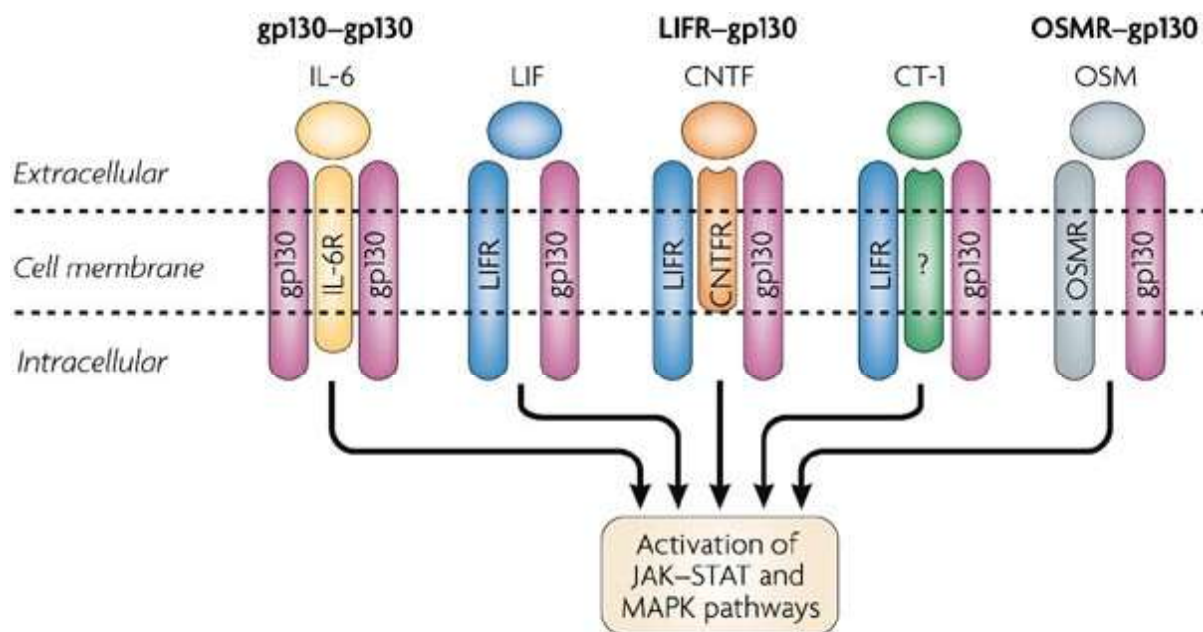


Figure 4 : Structure des récepteurs de la famille IL-6 (Bauer, Kerr et al. 2007)

vi. L'interleukine 11

L'interleukine 11 (IL-11) appartient aux cytokines de la famille IL-6. Elle a été isolée pour la première fois en 1990. L'interleukine-11 est une cytokine qui possède un large spectre d'actions sur différents types cellulaires. Elle a été initialement caractérisée pour sa capacité à stimuler la thrombopoïèse. Cependant, il a été démontré qu'elle était exprimée et qu'elle agissait sur de nombreux tissus autres que la moelle osseuse incluant : le cerveau, les neurones de la moelle épinière, les intestins et les testicules. D'une manière générale, l'IL-11 est exprimée par des cellules d'origine mésenchymale.

Le gène codant pour l'IL-11 possède cinq exons et 4 introns. Il est situé sur le chromosome 19 au niveau de la bande 19q13.3-q13.4. Dans les fibroblastes de la moelle osseuse, la transcription basale d'IL-11 est sous le contrôle des facteurs de transcription JunD/AP-1. Il a été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires que la production d'ARN messager d'IL-11 est induite par l'IL-1 α et le PMA. La partie 3' du gène contient deux sites de polyadénylation qui vont former deux variants d'ARN messager de 2,5 et 1,5 Kb. L'IL-11, bien que dépourvue de résidus cystéine, présente une structure à quatre hélices alpha (Du and Williams 1997) .

L'IL-11 est un facteur important de l'hématopoïèse. Elle agit en synergie avec d'autres facteurs précoces et tardifs pour stimuler les progéniteurs à différents stades de l'hématopoïèse. En synergie avec l'IL-3, l'IL-4, l'IL-12, l'IL-13, le SCF, le Flt3 ligand et le GM-CSF, l'IL-11 stimule, en culture, la prolifération des cellules souches primitives et des progéniteurs multipotents et engagés incluant les cellules de sang de cordon, de la moelle osseuse et du sang périphérique. Elle exerce son action en stimulant l'entrée des cellules en phase G1 du cycle cellulaire et en diminuant la durée du cycle (Du and Williams 1997).

L'IL-11 agit également en synergie avec l'IL-3 et la Tpo ou le SCF dans la stimulation de la mégacaryopoïèse et de la thrombopoïèse. *In vivo*, le traitement par l'IL-11 induit une stimulation marquée de la mégacaryopoïèse, chez les rongeurs, les primates non-humains et chez l'homme comprenant la production, la différenciation et la maturation des mégacaryocytes. Cet effet de l'IL-11 est dépendant de la Tpo, en effet, la présence de c-Mpl soluble ou d'anticorps anti-Tpo diminue de 90% la formation de colonies mégacaryocytaires induite par l'IL-11. Il a également été mis en évidence que l'effet synergique de l'IL-11 et de la Tpo sur la stimulation de la prolifération des progéniteurs multipotents, passant par la réduction de la durée de la phase G0, est en partie médié par l'interaction SCF/c-Kit.

L'IL-11, seule, ou en association avec le SCF, l'IL-3 et l'Epo, est capable de stimuler différents stades de l'érythropoïèse. Des expériences *in vivo* de traitement par les cytokines ont montrées que l'IL-11 et le SCF peuvent favoriser la différenciation des progéniteurs multipotents vers la lignée érythroïde ; alors qu'un traitement par l'IL-11 et l'Epo va stimuler l'amplification des cellules érythroïdes différenciées. Enfin, l'association de l'IL-11 et du SCF posséderait un effet dans la redistribution des cellules érythroïdes de la moelle osseuse vers la rate (Du and Williams 1997).

L'IL-11 module également la différenciation et la maturation des progéniteurs myéloïdes. En combinaison avec le SCF, elle stimule la formation *in vitro* de colonies composées principalement de granulocytes et de cellules myéloïdes non différenciées.

A l'origine, l'IL-11 a été isolée à partir de cellules dérivées du microenvironnement cellulaire. Elle peut donc agir sur cet environnement comme un facteur autocrine ou paracrine. En culture, l'IL-11 stimule la prolifération des cellules adhérentes de la moelle osseuse conduisant à une augmentation de l'hématopoïèse.

L'IL-11 possède aussi des effets non-hématopoïétiques. Notamment sur les cellules souches des cryptes gastro-intestinales. En effet, l'IL-11 induit une diminution de la prolifération de ces cellules en augmentant la durée de la transition vers phase G1S. L'IL-11 en combinaison avec d'autres facteurs joue un rôle dans la résorption osseuse par stimulation des ostéoclastes. Enfin, l'IL-11 possède des propriétés anti-inflammatoires. Elle serait impliquée dans la diminution de la production de TNF α par les monocytes/macrophages (Du and Williams 1997).

vii. L'interleukine 8

L'interleukine 8 (IL-8) appartient à la famille des chimiokines à motif CXC. L'IL-8 peut se lier à deux récepteurs CXCR-1 et CXCR-2. L'IL-8 se présente sous deux isoformes : l'isoforme « a » composé de 77 résidus, principalement produit par les cellules endothéliales ; et l'isoforme « b » composé de 72 résidus, tronqué dans la partie N-terminale, principalement produit par les monocytes et les lymphocytes. Les deux isoformes sont souvent produits par un même type cellulaire (Hermouet, Corre et al. 2000). Le gène codant pour l'interleukine 8 est situé sur le chromosome 4 au niveau de la bande 4q13-q21. Son promoteur contient un site de réponse pour le facteur de transcription NF κ B. La fixation de NF κ B induit un recrutement rapide de l'ARN polymérase II (environ une demie-heure après la stimulation par l'IL-1). Le cœur du promoteur contient également des sites de fixation pour les facteurs AP-1 et C/EBP

(CAAT/enhancer-binding protein). Ces deux facteurs ne sont pas indispensables à l'initiation de la transcription, mais contribuent à l'expression maximale du gène. Le facteur de transcription AP-1 est activé par la voie des JNK kinases. Il a été démontré, par des expériences d'inhibition par ARN interférence, que cette voie est essentielle à l'expression de l'IL-8 (Hoffmann, Dittrich-Breiholz et al. 2002). Par ailleurs, il a été mis en évidence que la voie des p38MAPK était essentielle à la stabilisation de l'ARN messager de l'IL-8 (Holtmann, Enninga et al. 2001).

L'IL-8 est présente dans le sérum des sujets sains à de faibles taux (< 20 pg/ml). C'est un facteur majeur de la réponse inflammatoire aigue. Elle agit en tant que chimio-attractant et activateur des neutrophiles. Bien que les monocytes et les macrophages expriment ses récepteurs, IL-8 n'a pas un grand effet de chimio-attractant sur ces cellules (Horuk 1994; Denizot, Fixe et al. 1996).

L'IL-8 est produite, *in vitro*, par de nombreux types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales pulmonaires, les cellules endothéliales, les kératinocytes, les lymphocytes T, les neutrophiles, les mastocytes et aussi les monocytes et les macrophages, en particulier quand ces derniers sont activés. De plus, en condition normale, les cellules stromales de la moelle osseuse et les progéniteurs hématopoïétiques CD34⁺ produisent de grandes quantités d'IL-8 (< 4 ng/ml) (Corre, Pineau et al. 1999).

Il a été démontré que l'IL-8 est capable d'inhiber la formation de BFU-E et de CFU-GM, probablement par interaction directe avec les progéniteurs hématopoïétiques humains (Broxmeyer, Cooper et al. 1996). L'IL-8 joue également un rôle dans l'hématopoïèse précoce en stimulant, de manière directe, la prolifération des progéniteurs CD34⁺ et en favorisant la différenciation vers la lignée monocyttaire et la prolifération des monocytes-macrophages en synergie avec le G-CSF. Il a été mis en évidence l'existence d'une boucle de régulation autocrine/paracrine de l'IL-8 sur les progéniteurs CD34⁺. En effet, il semblerait que ces progéniteurs expriment de faibles quantités de récepteurs à l'IL-8 (CXCR2 principalement) (Corre, Pineau et al. 1999). De plus, les progéniteurs CD34⁺ suite à la stimulation par des cytokines hématopoïétiques produisent de l'IL-8.

L'IL-8 est aussi produite par les cellules endothéliales. Une étude a mis en évidence le rôle de l'IL-8 dans l'angiogénèse par des expériences *in vitro* sur des cellules HUVEC. La stimulation de ces cellules par l'IL-8 induit une prolifération dose dépendante ainsi qu'une diminution de l'apoptose. Les cellules HUVEC expriment abondamment les récepteurs CXCR1 et CXCR2 de manière constitutive. De plus, suite à une stimulation par l'IL-8, il a été observé une augmentation dose-dépendante de l'activité MMP-2 et MMP-9, ayant pour

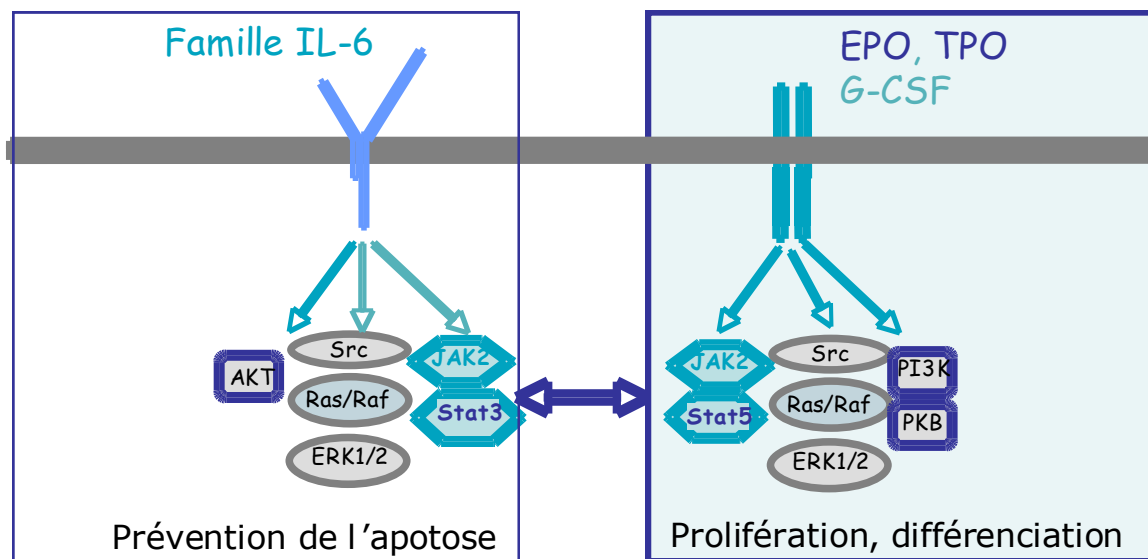


Figure 5: Schéma récapitulatif des cytokines hématopoïétiques activant JAK2

conséquence une augmentation de la dégradation de la matrice extracellulaire favorisant la migration des cellules endothéliales (Li, Dubey et al. 2002).

Les récepteurs de cytokines

i. Description générale

Les cytokines exercent leurs effets en se liant à des récepteurs présents à la surface des cellules. La dimérisation ou l'oligomérisation des complexes cytokine-récepteur est quasi constante. Les récepteurs peuvent être regroupés en 9 familles principales: a) les récepteurs des cytokines hématopoïétiques (récepteurs de classe I) comme la chaîne gp 130, la chaîne β commune (βc) et la chaîne γ commune (γc); b) les récepteurs de la famille interféron (IFN), IL-10 (récepteurs de classe II); c) les récepteurs des cytokines de la super famille des Tumor Necrosis Factor (TNF) (récepteurs de classe III) comme TNF-R, Fas, CD40, TRAIL-R; d) les récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines sans activité tyrosine kinase comme les IL-1-Rs; e) les récepteurs de la superfamille des Immunoglobulines avec activité tyrosine kinase comme le M-CSF-R, EGF-R et PDGF-R; f) les récepteurs à activité sérine/thréonine kinase des cytokines de la famille du TGF β comme le TGF β -R; g) les récepteurs à domaine sushi dont l'IL-2R α et l'IL-15R α ; h) les récepteurs des cytokines de la famille IL-17; i) les récepteurs à sept domaines transmembranaires des chimiokines comme CXCR-1, CXCR-2, les CCRs et le CX₃CR-1.

Les récepteurs de classe I présentent des régions conservées dans leur domaine extracellulaire. Ainsi, ils possèdent tous un à deux domaines « cytokine homology receptor domain » (CRH) et un motif WSXWS (Feese, Tamada et al. 2004).

ii. Le récepteur de l'érythropoïétine : EpoR

Le récepteur de l'érythropoïétine est un récepteur de cytokine de classe I qui existe sous deux formes : haute et basse affinité. Le récepteur de haute affinité est exprimé par les progéniteurs érythroïdes, le récepteur de basse affinité est exprimé par des organes et types cellulaires à l'extérieur de la moelle osseuse (Zvezdaryk, Coffelt et al. 2007). Le gène codant pour l'EpoR est situé sur le chromosome 19, au niveau de la bande 19p13.3-p13.2. Avec son ligand, l'érythropoïétine, il induit une cascade de signalisation responsable de la première ligne de régulation de l'érythropoïèse chez les mammifères. Le niveau d'expression de l'EpoR à la surface des cellules est très faible. En effet, même dans les lignées qui

surexpriment l'EpoR au niveau de l'ARN messenger, seule une petite fraction est produite à la surface. La tyrosine kinase JAK2 est impliquée dans la régulation de l'expression de l'EpoR à la surface des cellules en permettant à la forme non glycosylée (immature) présente dans le réticulum endoplasmique de passer dans l'appareil de Golgi afin d'y être glycosylée (forme mature) et conduire ainsi à son expression à la surface de la membrane plasmique (Huang, Constantinescu et al. 2001). Le récepteur de l'Epo ne possède pas d'activité kinase, celle-ci lui est apportée par association avec la tyrosine kinase JAK2 au niveau de la région Box1. La liaison de l'Epo à son récepteur induit la dimérisation de celui-ci, une phosphorylation de JAK2 suivie d'une phosphorylation par JAK2 du récepteur au niveau de sites de recrutement pour des protéines à domaine SH2 (sarcoma (src) homology) telles que Signal Transducer and Activator of Transcription 5 (STAT5). L'activation de cette voie de signalisation est cruciale pour la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes (Figure 6). Les deux formes de STAT5 : A et B sont phosphorylées en réponse à l'Epo. Cette voie est impliquée dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs érythroïdes. La voie Ras/MAPK est également activée par l'Epo. Cette voie participe à la stimulation de la prolifération. L'EpoR est associé de façon directe à la PI3K qui en réponse à l'Epo induit l'activation séquentielle de la phosphatase SH2 Domain-containing Inositol-polyphosphate (SHIP) et AKT (cellular homologue of the v-akt oncogene ou protéine kinase B), jouant ainsi un rôle important dans l'inhibition de l'apoptose. La liaison de l'Epo à son récepteur induit aussi l'activation de deux tyrosines phosphatases : SHP-1 (Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase) et SHP-2. Alors que SHP-2 semble avoir un rôle positif dans la stimulation de la prolifération, SHP-1 présente une action inhibitrice sur le signal. En effet, la liaison de SHP-1 sur la tyrosine 429 de l'EpoR induit une déphosphorylation de JAK2 (Lacombe C. et al. Haematologica, 1998).

L'érythropoïèse nécessite la présence d'Epo et de stem cell factor (SCF). En effet, pour avoir une activation complète de JAK2, les signaux induits par l'EpoR et c-kit (le récepteur du SCF) sont indispensables. En aval de ces signaux, la tyrosine kinase JAK2 va activer le facteur de transcription STAT5 qui va stimuler des voies de régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose. STAT5 cible des gènes tels que Pim, c-Myc, BclxL, Oncostatine M, SOCS et les cycline de type D (Grebien, Kerenyi et al. 2008). Comme décrit plus haut, le récepteur de l'érythropoïétine est aussi exprimé par des organes en dehors de la moelle osseuse comme le cerveau, mais également par les cellules endothéliales ou encore les myocardiocytes. Dans ce cas, l'érythropoïétine se comporte comme un facteur anti-apoptotique par activation de Bcl-XL via la voie JAK2/STAT5, de plus STAT5 interagit

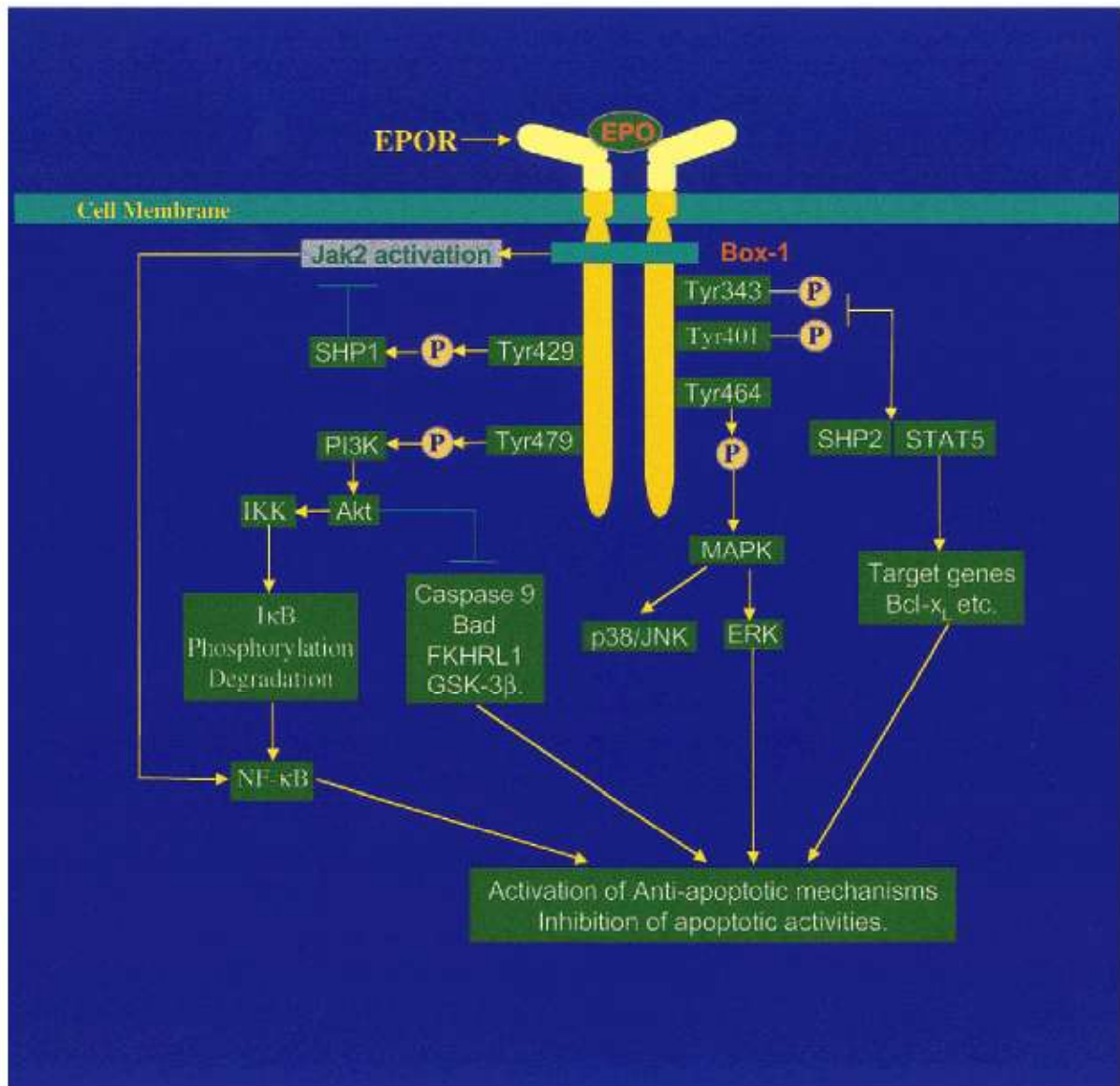


Figure 6: Signalisation de l'EpoR (Chong, Kang et al. 2002).

avec la PI3K qui est requise pour la poursuite du cycle cellulaire (Jelkmann W et al. *Oncol Hematol*, 2008).

La signalisation induite par la liaison de l'Epo sur son récepteur est régulée négativement par la protéine SOCS3. En effet, SOCS3 est capable de se lier à l'EpoR via son domaine SH2. SOCS 3 interagit également avec JAK2 dont elle inhibe l'activité kinase. Cette double interaction avec à la fois l'EpoR et JAK2 renforce l'effet négatif de SOCS3 sur la signalisation (Hookham, Elliott et al. 2007).

iii. Le récepteur du Stem Cell Factor : c-Kit

Le récepteur du SCF , c-Kit, appartient à la famille des récepteurs de cytokines de type III (Figure 7). Il est exprimé par les cellules souches hématopoïétiques, les cellules dendritiques, les cellules érythroïdes et mégacaryocytaires, les progéniteurs myéloïdes, les cellules pro-B et pro-T. L'expression de c-Kit est perdue au cours de la différenciation à l'exception des mastocytes matures.

La signalisation induite par le complexe SCF/c-Kit joue un rôle important dans la gamétopoïèse, l'hématopoïèse, l'érythropoïèse, le développement et la fonction des mastocytes et la mélanogénèse. Les cellules embryonnaires humaines expriment c-Kit et une absence de SCF ou de c-kit est létale.

En absence de SCF, c-Kit est présent sous une forme monomérique inactive. Le domaine intracellulaire juxtamembranaire est responsable de cet état dormant par une inhibition en cis qui maintient l'hélice αC et la boucle d'activation du domaine kinase dans leur conformation inactive. Le domaine juxtamembranaire inhibe également la dimérisation du récepteur en absence de ligand.

Le SCF se présente sous forme soluble comme un dimère non covalent formé par deux molécules de SCF. Le dimère de SCF forme le complexe de signalisation par liaison aux domaines Ig-like II et III. Le domaine Ig-like IV est impliqué dans la dimérisation du récepteur. C'est ce complexe qui entraîne le recrutement et la dimérisation de c-Kit conduisant ainsi au complexe actif pour la transduction du signal. Suite à la formation du complexe de signalisation, le récepteur va s'auto-phosphoryler sur des résidus tyrosines. Ces résidus représentent des sites de liaison pour des protéines à domaine SH2. Le signal induit par c-Kit active Akt, les kinases de la famille Src Lyn et Fyn, la Pi3K, la Phospholipase C γ , les tyrosine phosphatases SHP-1 et 2 et les Ras/MAPK (Roskoski 2005).

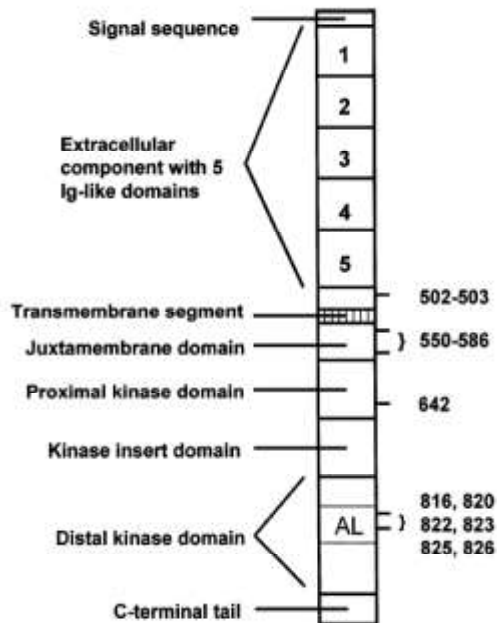


Figure 7 : Structure de c-Kit (Roskoski 2005)

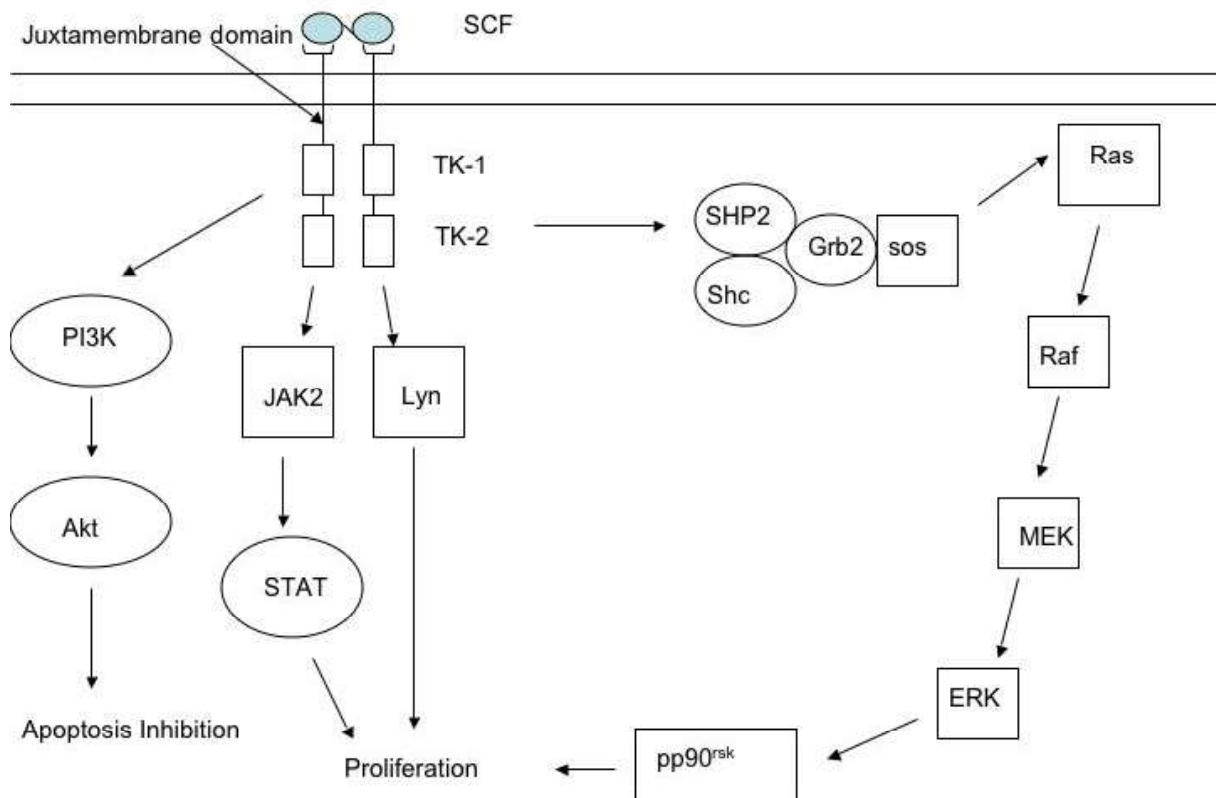


Figure 8: Complexe SCF/c-Kit et signalisation (Benson 2008)

Les kinases de la famille Src (sarcoma) possèdent des rôles clés dans la différenciation cellulaire, la motilité, la prolifération, l'adressage (trafficking) des protéines et la survie. Les membres de cette famille sont exprimés par tous les types cellulaires. Parmi eux, Blk, Fgr, HcK, LcK et Lyn sont exprimés principalement par les cellules hématopoïétiques

Il a été mis en évidence que Lyn est impliquée dans la voie de stimulation de la prolifération en aval de c-Kit dans un modèle de mastocytes murins au niveau de la moelle osseuse (Shivakrupa and Linnekin 2005).

Les phospholipases C (PLC) représentent une famille d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse du phosphatidylinositol 4,5-biphosphate en inositol 1,4,5-triphosphate et diacylglycerol. L'inositol triphosphate induit une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Cette voie de signalisation est impliquée dans plusieurs fonctions comme la différenciation, la division cellulaire, la motilité, la survie, la fertilisation de l'œuf et la réponse immunitaire. Le récepteur c-Kit recrute la PLC γ au niveau de la tyrosine 730 qui contient un site de liaison pour le domaine SH2 des PLC (Gommerman, Sittaro et al. 2000). Lors d'une étude réalisée sur des cellules HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells), il a été mis en évidence que la stimulation par le SCF soluble induit l'activation des voies Pi3K/Akt et MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) /Erk (extracellular signal-regulated kinase)1/2 mais pas la PLC γ (Matsui, Wakabayashi et al. 2004). Ces résultats, associés à ceux d'une autre équipe (Gommerman, Sittaro et al. 2000), ont permis de suggérer que la PLC γ était requise pour la signalisation induite par la forme membranaire du SCF et non par celle induite par la forme soluble.

L'activation de la Pi3K en aval de c-Kit induit le recrutement de la sérine/Thréonine kinase Akt. Parmi les substrats d'Akt, on trouve la protéine Bad (Bcl2 agonist of cell death). Bad est une protéine pro-apoptotique qui se trouve inactivée suite à sa phosphorylation par Akt. L'activation de cette voie par c-Kit possède donc un effet anti-apoptotique.

La régulation de l'expression de c-Kit se fait via SHP-1 et 2. SHP-1 est une protéine à domaine SH2 impliquée dans la régulation des signaux induits par les facteurs de croissance. La régulation par SHP-1 a lieu principalement dans les cellules hématopoïétiques et épithéliales. SHP-1 est connue pour diminuer l'effet de stimulation de la prolifération induit par le G-SCF, l'Epo et l'IL-3. Elle exerce sa fonction de régulateur négatif, soit directement par déphosphorylation du récepteur, soit indirectement par déphosphorylation de tyrosines kinases associées au récepteur. Dans le cas de c-Kit, SHP-1 possède un effet direct par liaison

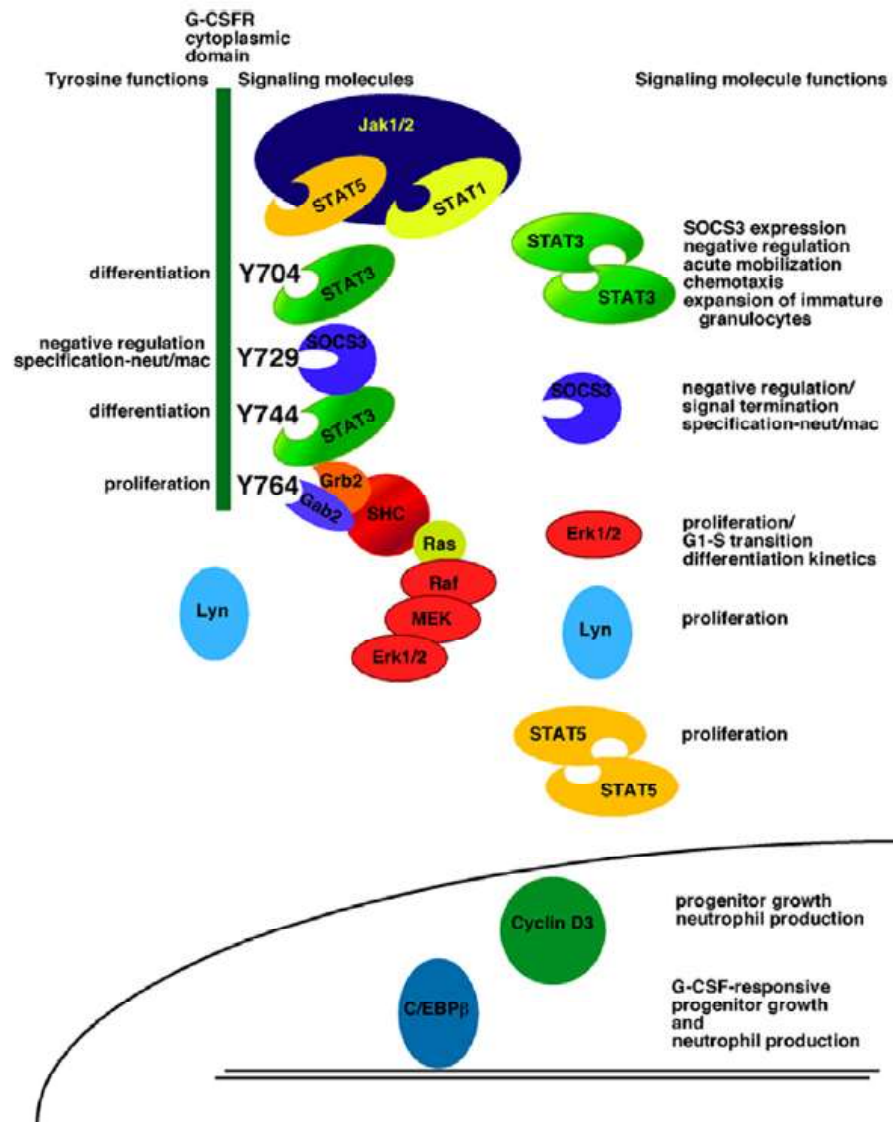


Figure 9 : Signalisation par le complexe G-CSF/G-CSFR (Panopoulos and Watowich 2008)

entre son domaine SH2 et la tyrosine Y570 de c-Kit. SHP-2, quant à elle, est exprimée par de nombreux types cellulaires. Dans le cas de c-Kit, elle exerce son activité également de façon directe par liaison à la tyrosine Y568. Finalement, étant donné que SHP-1 et 2 se lient à deux résidus distincts, la régulation du signal induit par c-Kit peut être effectuée simultanément par les deux tyrosines phosphatases (Figure 8)

Le récepteur c-Kit est capable d'interagir avec le récepteur de l'Epo par association au niveau de la région Box2 de ce dernier. L'association de ces récepteurs entraîne la phosphorylation de l'EpoR ce qui a pour effet de promouvoir la prolifération et la différenciation érythroïde. Cette coopération est essentielle pour la différenciation érythroïde (Lacombe C. et al. *Haematologica*, 1998).

iv. Le récepteur du G-CSF : GCSFR

Le récepteur du G-CSF (G-CSFR) est un récepteur de cytokine de type I composé pour sa partie extramembranaire d'un domaine conservé « cytokine receptor homologue » (CRH), d'un domaine Immunoglobuline –like (Ig-like) et de trois domaines fibronectin type III-like. Il possède également une partie transmembranaire et une partie intracellulaire dépourvue d'activité kinase

La liaison du G-CSF à son récepteur induit la formation d'un homodimère par interaction d'une part, entre la molécule de G-CSF et le domaine Ig-like du premier récepteur, et d'autre part, entre le G-CSF et le domaine CRH du second récepteur. Ce complexe possède des homologies de structure avec le complexe IL-6/IL-6R α /gp130.

Le G-CSFR est exprimé au niveau de la moelle osseuse par les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs de la lignée granulocytaire. Mais, ce récepteur est également présent en dehors de la moelle osseuse, on retrouve au niveau du placenta, des neurones du système nerveux central, des cellules souches neuronales adultes, des cellules endothéliales et des cardiomyocytes. Par contre, il n'est pas exprimé par les érythrocytes, les lymphocytes et les éosinophiles. Le G-CSFR est exprimé de manière croissante des progéniteurs granulocytaires aux neutrophiles matures durant la différenciation.

L'expression du G-CSFR est requise tout au long du développement des neutrophiles. La protéine STAT3 semble avoir un rôle critique, de régulateur négatif, dans les stades finaux de la granulopoïèse. En effet, la voie STAT3 contrôle l'expression de SOCS3, lui-même responsable de l'internalisation et de la dégradation du récepteur. STAT3 agit sur la

mobilisation des neutrophiles vers la circulation sanguine en modulant les signaux transduits par les ligands du récepteur de chimiokine CXCR2 : par exemple MIP-2 et IL-8.

Le G-CSFR est couplé à JAK1 et JAK2 au niveau de la région proximale de son domaine intracellulaire. La région distale du G-CSFR possède quatre tyrosines servant au recrutement de protéines à domaine SH2. La signalisation en aval de ce récepteur implique les voies de STAT1 et 5 ; de Ras/MEK/Erk 1/2 ; des Src kinases Lyn et Hck ; de la sérine/thréonine kinase AKT et de la tyrosine kinase Syk (Figure 9). L'expression à la surface du G-CSFR est régulée négativement par la tyrosine phosphatase SHP-1 et par la molécule Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) ; ces régulateurs provoquent l'internalisation et la dégradation du récepteur.

v. Le récepteur de la thrombopoïétine : c-mpl

Le récepteur de la thrombopoïétine : c-Mpl appartient à une sous-classe de récepteurs hématopoïétique de type I. Ce récepteur est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, les cellules de la lignée mégacaryocytaire et les plaquettes. La signalisation induite par la fixation de la Tpo sur c-Mpl active les voies des MAPK/Erk1/2, la voie Pi3K/Akt et la voie JAK2/STAT5 (Figure 10). La voie de la Pi3K possède un effet anti-apoptotique alors que la voie JAK/STAT stimule principalement la prolifération des mégacaryocytes (Majka, Ratajczak et al. 2002).

L'effet anti-apoptotique du signal transduit par l'association de la Tpo à son récepteur s'exerce via la liaison de STAT5, dont la localisation est régulée par la Pi3K, et des sous-unités p50 et c-Rel de NFκB sur le promoteur du gène Bclx. Les molécules de la famille Bcl2, dont BclxL fait partie, protègent les cellules de l'apoptose en inhibant la libération du cytochrome c par la mitochondrie. (Kirito, Watanabe et al. 2002).

vi. Les récepteurs de la famille IL-6

La transduction du signal chez les cytokines de la famille IL-6 est assurée par la formation d'un complexe hétérodimérique. Ce complexe est formé par l'association de la chaîne spécifique de la cytokine, mais dépourvue d'activité de transduction de signal, avec la chaîne commune gp130. La chaîne gp130 est exprimée de façon ubiquitaire, c'est donc l'expression ciblée des récepteurs spécifiques qui détermine les cibles cellulaires des cytokines de cette famille (Heinrich, Behrmann et al. 2003).

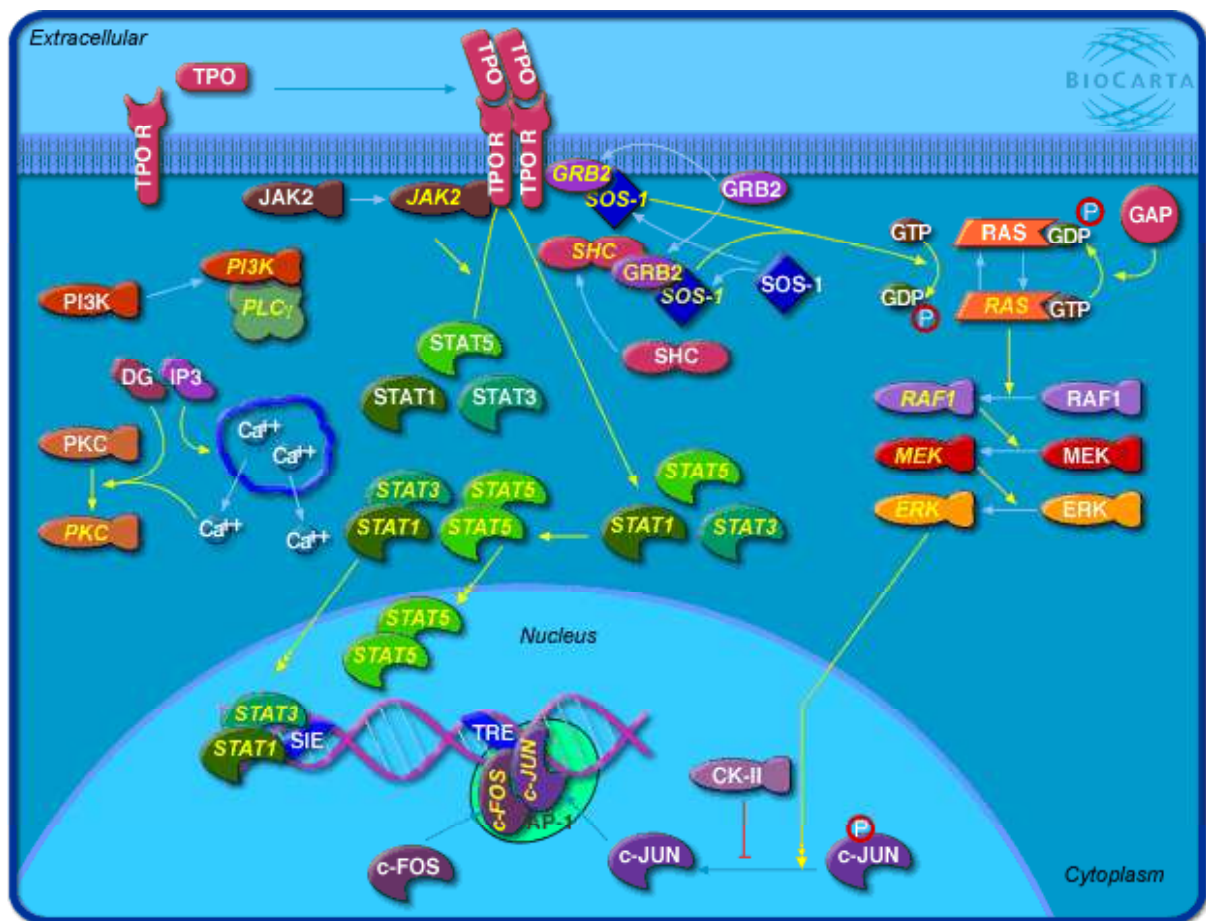


Figure 10 : Signalisation Tpo/c-Mpl (site web biocarta)

a) L'IL-6 récepteur α

La chaîne α du récepteur de l'IL-6, également appelé gp80, est une chaîne spécifique capable de lier la cytokine, mais dépourvue d'activité de transduction du signal. L'expression de l'IL-6R α est restreinte à certains types cellulaires comme les hépatocytes et les lymphocytes B. Son expression à la surface des cellules est régulée par les glucocorticoïdes. La signalisation induite par la formation du complexe hexamérique IL-6/IL-6R α /gp130 (Figure 11) active les voies JAK/STAT, MAPK, SHP-2 et SOCS3.

Il existe une forme soluble de l'IL-6R α (sIL-6R α). Cette forme peut être obtenue soit par épissage alternatif soit par clivage protéolytique de la forme membranaire (Müllberg, Schooltink et al. 1993; Horiuchi, Koyanagi et al. 1994). Contrairement aux autres récepteurs solubles de cytokines, le sIL-6R α présente une activité agoniste. Le complexe IL-6/sIL-6R α possède deux fonctions. La première est une fonction agoniste de trans-signalisation par liaison avec la forme membranaire de la gp130 permettant ainsi la transduction du signal par des cellules qui n'expriment pas l'IL-6R α . Il semblerait que la trans-signalisation soit plus efficace que l'IL-6R α membranaire (Fernandez-Botran, Chilton et al. 1996; Gaillard, Liautard et al. 1997). Cette fonction agoniste a été confirmée dans des modèles de souris transgéniques (Peters, Jacobs et al. 1996; Peters, Schirmacher et al. 1997). La deuxième fonction potentielle du sIL-6R α serait dans le contrôle de l'activité de l'IL-6 circulante. Cette deuxième fonction se ferait en association avec la forme soluble de la gp130 (Heinrich, Behrmann et al. 2003).

La liaison de l'IL-6 à sa chaîne réceptrice α entraîne le recrutement de la chaîne gp130. La formation du complexe de signalisation active les tyrosines kinases JAK1, JAK2 et TYK2 qui sont pré-liées à la gp130, au niveau de la région entre Box1 et Box2, via leur domaine FERM. Les JAKs activées vont à leur tour phosphoryler les facteurs de transcription STAT, en particulier STAT3. Par ailleurs, l'activation de Ras va induire d'autres voies de signalisation : en amont Ras va activer Shc, Grb-2 et Sos-1, et en aval, Ras va activer la voie des MAPK. Ces voies vont entraîner l'activation de facteur de transcription tels qu'ELK-1 et NF-IL-6 (C/EBP-beta) (Figure 11)

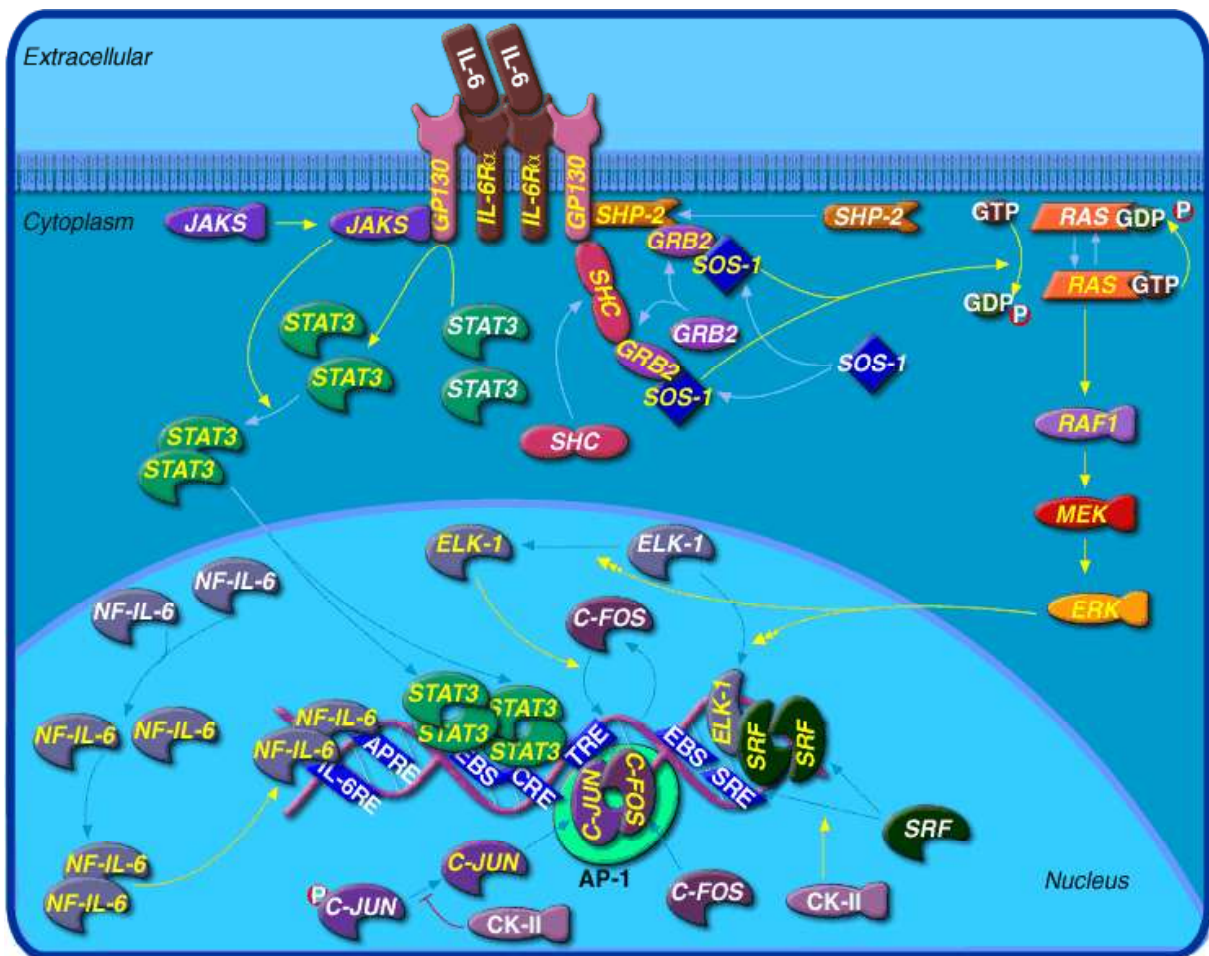


Figure 11 : Signalisation induite par le complexe IL-6/IL-6Rα/gp130 (site web biocarta).

b) L'IL-11 récepteur α

L'IL-11 récepteur α (IL-11R α) possède une homologie de séquence avec les chaînes alpha des récepteurs de l'IL-6 et du CNTF. L'ADN complémentaire de l'IL-11R α a été isolé par *Nandurkar et al. 1997*. La région extracellulaire de l'IL-11R α humain contient un domaine hématopoïétine ainsi que les motifs conservés propres aux récepteurs de type I.

Il existe deux isoformes de l'IL-11R α qui diffèrent au niveau de leur domaine cytoplasmique. L'un des isoformes, l'IL-11R α 1, est similaire à l'IL-6R α et à l'IL-11R α murin. Il possède un domaine cytoplasmique court. Le deuxième isoforme, l'IL-11R α 2, est similaire du récepteur α du CNTF. Cet isoforme ne possède pas de domaine intracytoplasmique. La structure génomique de l'IL-11R α 1 comprend 12 exons et 12 introns. Le gène de l'IL-11R α est situé sur le chromosome 9 au niveau de la bande 9p13, le gène du CNTF récepteur se trouve dans la même zone.

L'IL-11 se fixe sur la chaîne alpha de son récepteur avec une faible affinité. La génération d'un complexe de haute affinité capable de transduire un signal requiert la coexpression de la chaîne gp130. L'ARN messager de l'IL-11R α est exprimé par les tissus hématopoïétiques (moelle osseuse, rate et thymus) mais aussi le foie, le cerveau, le cœur, les reins, mes muscles, les glandes salivaires et le tractus gastro-intestinal.

La liaison de l'IL-11 à l'IL11R α induit l'hétérodimérisation avec la gp130 puis l'association de deux complexes IL-11/IL-11R α /gp130 pour la formation d'un complexe hexamérique. La formation de ce complexe induit la phosphorylation de résidus tyrosines et l'activation de la gp130. La cascade de signalisation activée en aval du complexe commence avec l'activation de tyrosines kinases de la famille JAK, en particulier JAK1 mais aussi JAK2. La voie Ras/MAPK est également activée. Il a été démontré que JAK2 forme un complexe avec la protéine adaptatrice Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) et la gp130. Ce complexe permet le recrutement de SOS (son of sevenless) au niveau de la membrane plasmique, où Ras est localisée, et va permettre l'activation de Ras. En plus de la voie des MAPK, la gp130 peut activer la protéine ribosomale S6 kinase pp^{90rsk} qui va activer un groupe de gènes communs codant pour les phosphatases qui vont inactiver les MAPK. La famille des kinase Src est également impliquée dans la signalisation induite par l'IL-11. En particulier la tyrosine kinase Fyn qui s'associe de façon transitoire avec JAK2 à la protéine Grb2, ceci suggère que l'activation de Ras par l'IL-11 est médiée partiellement par Fyn (Du and Williams 1997).

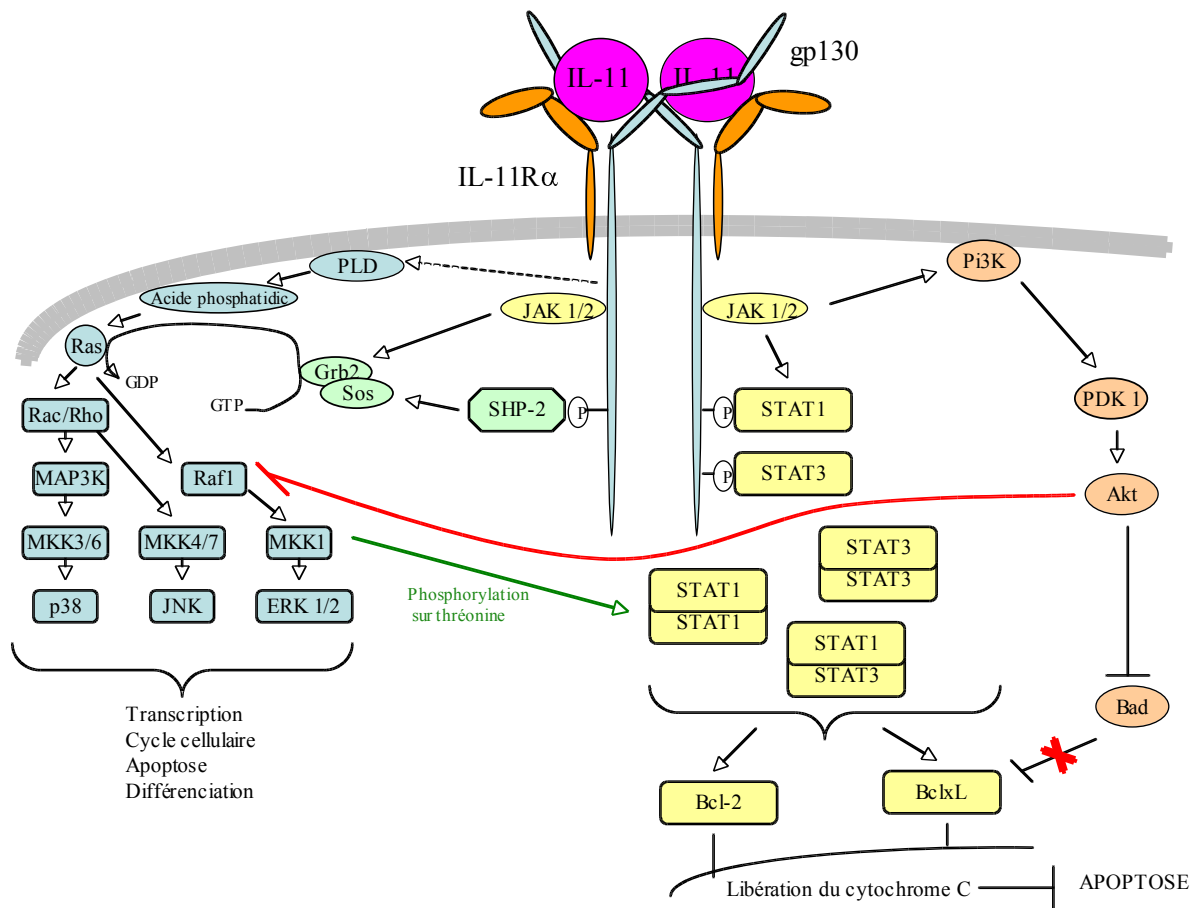


Figure 12 : Signalisation IL-11/IL-11Rα/gp130 d'après (Du and Williams 1997; Heinrich, Behrmann et al. 1998; Mahboubi, Biedermann et al. 2000; Heinrich, Behrmann et al. 2003)

c) La gp130

La gp130 est une protéine ubiquitaire identifiée initialement comme la chaîne de transduction de signal du récepteur de l'IL-6. Le gène codant pour la gp130 se trouve sur le chromosome 5 au niveau de la bande 5q11. La transcription de la gp130 donne lieu à deux isoformes. L'isoforme 1 va donner la protéine complète. L'isoforme 2 est délété d'une partie interne de la séquence codante résultant en une protéine dont les domaines C-terminal et N-terminal sont tronqués par rapport à ceux de la protéine traduite depuis l'isoforme 1. Ce second isoforme correspondrait, en fait, au pseudogène de la gp130, situé sur le chromosome 17 au niveau de la bande 17p11 (Rodriguez, Grosgeorge et al. 1995). Il existe également une forme soluble de la gp130. Cette forme est présente dans le sérum à l'état naturel. Elle est capable de s'associer à la forme soluble de l'IL-6R α , en présence d'IL-6, est joue alors un rôle antagoniste. En effet, la formation de ce complexe empêche la trans-signalisation (Müller-Newen, Küster et al. 1998).

Le domaine extracellulaire de la gp130 est composé de six domaines individuels. Le domaine 1 (D1) est un domaine Immunoglobulin-like (Ig-like), les domaines D2 et D3 forment le domaine de liaison à la cytokine (Cytokine Binding Domain : CBD) et les domaines D4 à D6 sont trois domaines fibronectine type III like. Dans le cas de la signalisation par l'IL-6 et l'IL-11, le domaine Ig-like est requis pour l'activation de la gp130 en plus du domaine CBD (Timmermann, Pflanz et al. 2000) (Figure 13).

La gp130 est la chaîne de transduction de signal commune aux récepteurs des cytokines de la famille IL-6. L'engagement de la gp130 active les kinases Src et JAKs, pré-liées au récepteur, ainsi que le recrutement et l'activation des facteurs de transcription STAT, principalement STAT1 et STAT3. Etant donné que les cytokines de la famille IL-6 utilisent la gp130 pour transduire leur signal, il est logique que ces cytokines présentent certains effets communs : prolifération et différenciation des cellules hématopoïétiques et des cellules neurales, réponse immunitaire, action pro- ou anti-inflammatoire (Tenhumberg, Schuster et al. 2006). La spécificité de signal est donc donnée par le complexe, formé par la cytokine et la chaîne α du récepteur, qui va entrer en contact avec la gp130. De plus, il a été mis en évidence que des résidus distincts du CBD de la gp130 sont impliqués dans la liaison à l'IL-6 et l'IL-11 en comparaison du LIF et de l'OSM (Timmermann, Pflanz et al. 2000). Ces différences au niveau du site de liaison contribuent à la spécificité d'activation de la gp130.

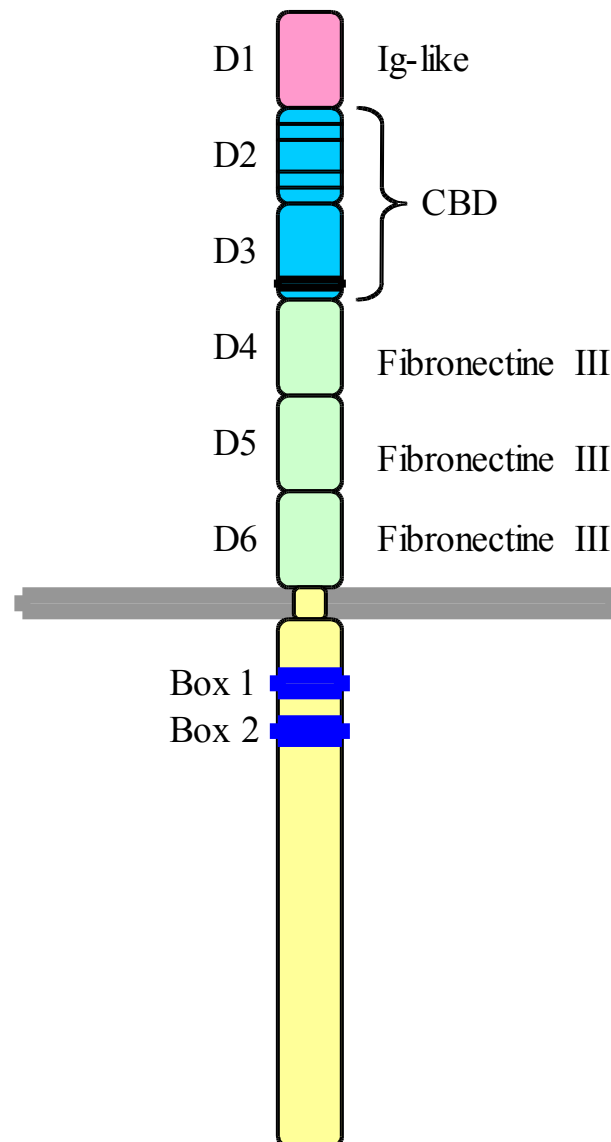


Figure 13 : Structure de la gp130 d'après (Timmermann, Pflanz et al. 2000)

Suite à la liaison du ligand sur sa chaîne α et au recrutement de la gp130, un mécanisme de contrôle se met rapidement en place et conduit à une internalisation du complexe. Ce mécanisme d'internalisation met en jeu le domaine intracellulaire de la gp130. En effet, la gp130 possède une séquence de dix résidus incluant un motif di-leucine : « TQPLLDSEER » impliqué à la fois dans l'internalisation du complexe et dans le ciblage pour la dégradation par les lysosomes (Dittrich, Haft et al. 1996).

d) Les récepteurs de l'IL-8

Les récepteurs de chimiokines appartiennent à la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G. L'IL-8 peut se lier à deux récepteurs : CXCR1 et CXCR2 qui possèdent une homologie de séquence en acides aminés de 77%. Les deux récepteurs peuvent lier l'IL-8 avec une haute affinité mais seul CXCR1 est spécifique de l'IL-8. CXCR2 lie également GRO α (growth-related gene α), NAP-2 (neutrophil activating protein 2) et PF-4. Il existe un troisième récepteur dépourvu d'activité de transduction de signal exprimé uniquement par les cellules érythroïdes. Ce récepteur se lie au parasite du paludisme *Plasmodium vivax*, il pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la concentration d'IL-8 soluble (Hermouet, Corre et al. 2000).

En général, les cellules qui produisent de l'IL-8 expriment aussi ses récepteurs. C'est le cas pour les cellules épithéliales, endothéliales et stromales, ainsi que pour les mégacaryocytes et toutes les cellules matures du sang. CXCR1 et CXCR2 sont exprimés tous les deux par ces cellules et CXCR2 est toujours plus fortement exprimé que CXCR1 sauf en ce qui concerne les lymphocytes T quiescent du sang circulant pour lesquels les niveaux d'expression des deux récepteurs sont similaires.

Les mécanismes de régulation des récepteurs de l'IL-8 sont peu connus. Après stimulation par l'IL-8, CXCR1 et CXCR2 sont redistribués de la membrane vers les compartiments intracellulaires suite à leur phosphorylation par les kinases couplées aux récepteurs à protéines G. Ils peuvent également être internalisés suite à l'activation d'autres récepteurs à protéines G. Dans ce cas, c'est l'activation de la PKC qui conduit à la phosphorylation des récepteurs et à leur internalisation (Richardson, Pridgen et al. 1998; Ali, Richardson et al. 1999). CXCR2 est généralement internalisé plus rapidement que CXCR1. Enfin, CXCR1 et CXCR2 peuvent être régulés négativement suite à un clivage extracellulaire par les métalloprotéases de la matrice (Khandaker, Mitchell et al. 1999). Plus récemment, il a

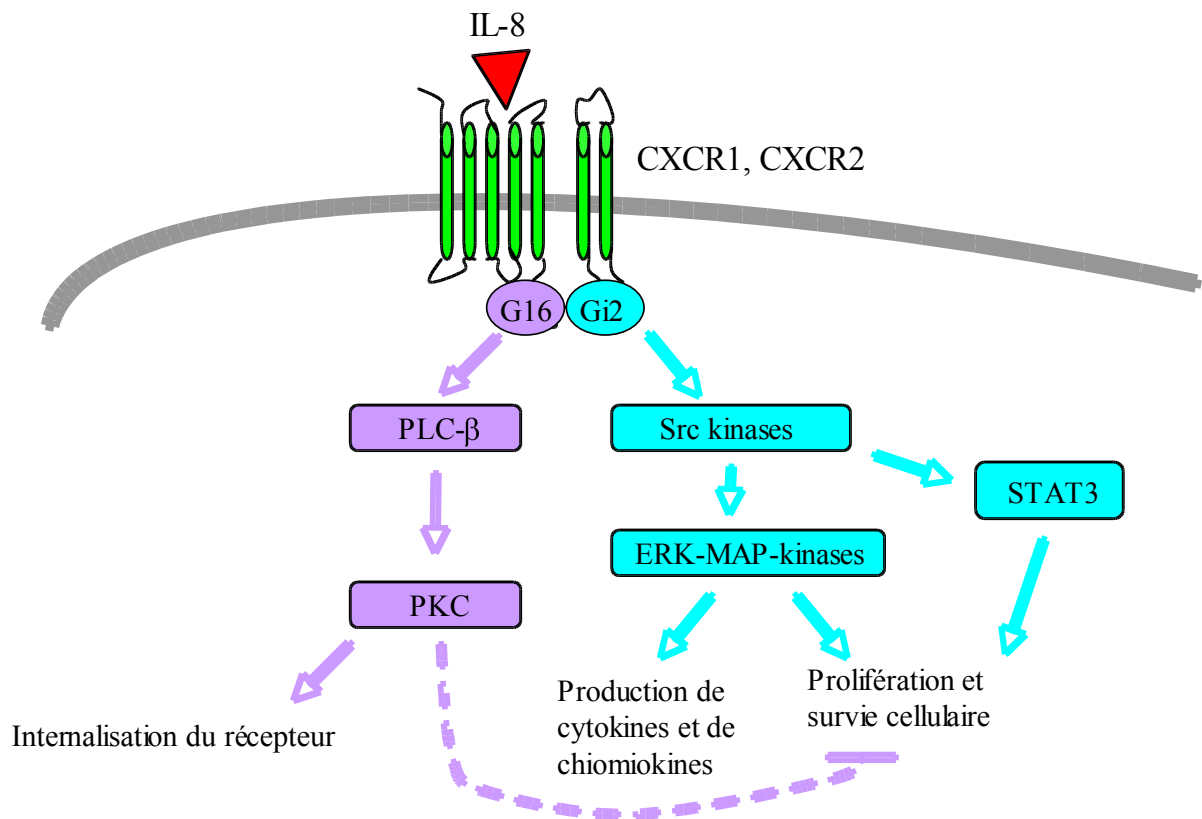


Figure 14 : Signalisation IL-8/CXCR1 et CXCR2 d'après (Hermouet, Corre et al. 2000)Leukemia and Lymphoma, 2000.

été mis en évidence lors d'une étude sur le cancer de la prostate qu'en condition d'hypoxie, on observe une augmentation de l'expression de CXCR1 et CXCR2 en réponse à l'HIF1 α et à NF κ B (Maxwell, Gallagher et al. 2007).

La signalisation par l'IL-8 est sensible à la toxine pertussique suggérant que les signaux sont transduits via des protéines hétérotrimériques Gi, sensibles à cette toxine, et en particulier via Gi2, une protéine ubiquitaire. De plus, les récepteurs de l'IL-8 peuvent lier la protéine G16 mais pas la protéine Gq. CXCR1 et CXCR2 sont tous deux capables d'activer les voies des MAPK ERK1/2 et de la PLC, mais seul CXCR1 peut activer la phospholipase D. L'IL-8 induit également la voie de la Pi3K, cette voie est importante dans la fonction chimioattractante de l'IL-8. Ainsi, la voie de la Pi3K mais pas celle des MAPK est nécessaire à la migration des neutrophiles.

Les voies des MAPK et des Src kinases sont essentielles dans la prolifération cellulaire, en particulier quand ces voies sont activées par des cytokines hématopoïétiques ou par les récepteurs des cellules T (TCR). Les kinases de la famille Src (Src, Lyn, Fyn) régulent la progression du cycle cellulaire. L'inactivation de cette voie a été décrite comme inhibant la prolifération induite par le G-CSF, le SCF, le GM-CSF, l'IL-6, l'IL-3 et l'Epo. De plus, la voie des Src kinases induit l'activation de STAT3 indépendamment de la voie des JAKs. Cette activation est une étape nécessaire à la survie et la prolifération des cellules induites par l'IL-6, le G-CSF, le GM-CSF et l'IL-3 (Figure 14).

POINT DES CONNAISSANCES

Cytokines, Hématopoïèse et Syndromes Myéloprolifératifs

Les cytokines jouent un rôle primordial dans la régulation de l'hématopoïèse. Leur production et leurs voies de signalisation sont souvent altérées dans les maladies hématologiques.

Les chapitres suivants ont pour but de faire un état des lieux de ce qui est connu en matière d'anomalies pouvant contribuer à la dérégulation de l'hématopoïèse caractéristique des SMP.

I. La tyrosine kinase JAK2

Description générale

La famille des Janus Kinase (JAK) comporte quatre membres : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. L'expression de JAK3 est restreinte aux cellules hématopoïétiques alors que les autres membres de la famille ont une expression ubiquitaire. Les tyrosines kinase JAK sont couplées aux récepteurs de cytokines de types I et II qui ne possèdent pas d'activité kinase intrinsèque. Les tyrosines kinases de la famille JAK sont composées de sept domaines homologues : JAK Homology (JH). Le domaine C-terminal JH1 possède l'activité tyrosine kinase. Le domaine JH2 est un domaine pseudo-kinase, il sert de boucle de régulation de l'activité kinase de JH1. Les domaines JH3 à JH7 forment le domaine FERM pour : 4.1 protein ezrin, radixin, moesin. Ce domaine sert à liaison au récepteur. En réponse à la liaison de la cytokine sur sont récepteur, les JAKs sont phosphorylées et recrutées au niveau de la partie juxta-membranaire du récepteur. Elles vont ensuite phosphoryler celui-ci sur des sites de liaison pour des protéines adaptatrice à domaine SHP2, et permettre ainsi le recrutement des « Signal Transducer and Activator of Transcription » (STAT).

La tyrosine kinase JAK2 est couplée à certains récepteurs de cytokines hématopoïétiques comme l' EpoR, le G-SCFR, cKit et la gp130. Ces récepteurs sont exprimés à la surface des progéniteurs hématopoïétiques.

Les mutations de JAK2 dans les syndromes myéloprolifératifs.

Les anomalies des tyrosines kinases sont fréquentes dans les cancers : par exemple la protéine de fusion BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique. En 2005, une mutation au niveau de l'exon 14 (domaine JH2) de JAK2 a été mise en évidence (James C et al. *Nature*, 2005) et confirmée par plusieurs groupes (Kralovics R et al. *N Engl J Med*, 2005 ; Levine RL et al. *Cancer Cell*, 2005 ; Baxter EJ et al. *Lancet*, 2005). Cette mutation substitue une guanine pour une thymine en position 1849 avec pour conséquence l'échange d'une valine pour une phénylalanine en position 617. Elle sera donc référencée comme la mutation JAK2V617F (Figure 15). Cette mutation a été décrite comme une mutation gain de fonction conduisant à une tyrosine kinase très sensible à l'activation par les cytokines (Kralovics, Passamonti et al. 2005). Elle est présente dans plus de 90% des PV, dans 50% des MFP soit à l'état homozygote, soit à l'état hétérozygote et dans environ 70% des TE uniquement à l'état hétérozygote. Le passage à l'état homozygote résulte d'une recombinaison homologue d'une partie du chromosome 9p et conduit à l'élimination de la forme sauvage de JAK2 et à une forme plus agressive de la maladie (Figure 16) (Kralovics R et al. *NEJM*, 2005).

De nombreuses questions restent en suspens concernant l'importance de JAK2V617F : a) comment une seule mutation contribue à trois phénotypes différents (PV, TE, MFP) ; b) est-elle à l'origine des SMP ou agit-elle en coopération avec d'autres mutations ? (Skoda RC *Eur J Haematol*, 2007).

Récemment, d'autres mutations, au niveau de l'exon 12 de JAK2, ont été identifiées chez les patients négatifs pour la mutation JAK2V617F. Ces mutations sont variables, ne sont pas restreintes à un seul acide aminé et trois d'entre elles incluent le changement d'une leucine pour une lysine en position 539 (Scott, Tong et al. 2007).

Elles sont présentes chez les patients à de faibles pourcentages (< 20%) et quasiment toujours à l'état hétérozygote. Quelques cas d'homozygotie ont été décrits, notamment un cas de PV présentant une perte d'hétérozygotie 9p (Li, Kralovics et al. 2008) et deux cas de PV familiales (Percy, Scott et al. 2007; Pietra, Li et al. 2008). De plus, contrairement à la mutation JAK2V617F, les mutations de l'exon 12 sont détectées uniquement dans les syndromes myéloprolifératifs présentant une érythrocytose pure, c'est à dire la PV et certains patients diagnostiqués initialement comme érythrocytose idiopathique. Les patients sont

significativement plus jeunes au diagnostic, ils présentent un taux d'Epo sérique très bas, et des chiffres de leucocytes et de plaquettes le plus souvent normaux.

Les mutations de l'exon 12 et de l'exon 14 de JAK2 permettent la pousse endogène de colonies érythroïdes en absence d'Epo. Les cellules porteuses de ces mutations présentent une augmentation de la phosphorylation de JAK2 et STAT5 par rapport aux cellules non porteuses. Il a également été observé dans ces cellules une activation constitutive de la voie Ras-Erk avec des niveaux de phosphorylation de ERK1 et de ERK2 supérieurs à ceux mesurés avec les formes sauvages. La mise au point d'un modèle de greffe chez la souris a mis en évidence que l'expression de ces mutations conduisait au développement d'un syndrome de type SMP (Scott, Tong et al. 2007).

Toutes ces observations pourraient indiquer que les mutations de l'exon 12 sont plus actives que la mutation V617F. De plus, les mutations de l'exon 12 semblent spécifiques du phénotype polyglobulique, en effet, elles sont présentes uniquement chez des patients atteints de PV.

Par ailleurs, il a récemment été décrit deux cas familiaux de PV dont l'un des membres est porteur d'une mutation de l'exon 12 seulement alors qu'un autre membre de la famille était porteur de la mutation V617F. Alors que les sujets porteurs de la mutation de l'exon 12 ne présentaient qu'une érythrocytose marquée, leurs parents porteurs de la mutation V617F présentaient également une thrombocytose. Ces études des cas familiaux de SMP montrent que si les mutations de JAK2 sont des événements somatiques, acquis comme dans les cas sporadiques et probablement secondaires. L'évènement moléculaire prédisposant à l'apparition de ces mutations peut, quant à lui, être héréditaire (Pietra, Li et al. 2008).

La détection des mutations de JAK2 est essentielle au diagnostic des SMP sans pour autant permettre d'identifier la nature de celui-ci. Leur degré d'implication dans la pathogénèse et le pronostic est encore en cours d'étude.

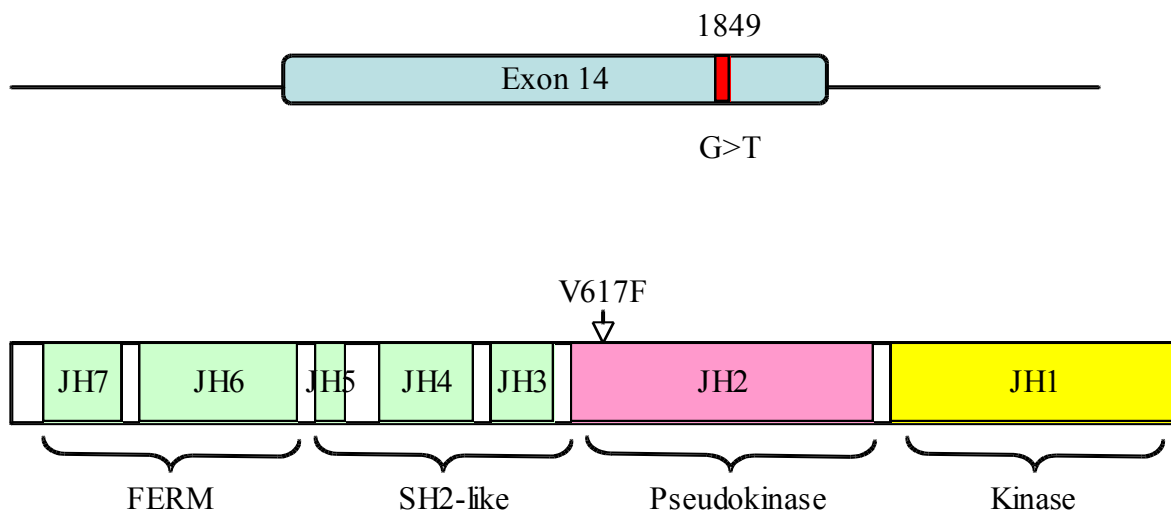


Figure 15 : Structure de JAK2 et localisation de la mutation V617F

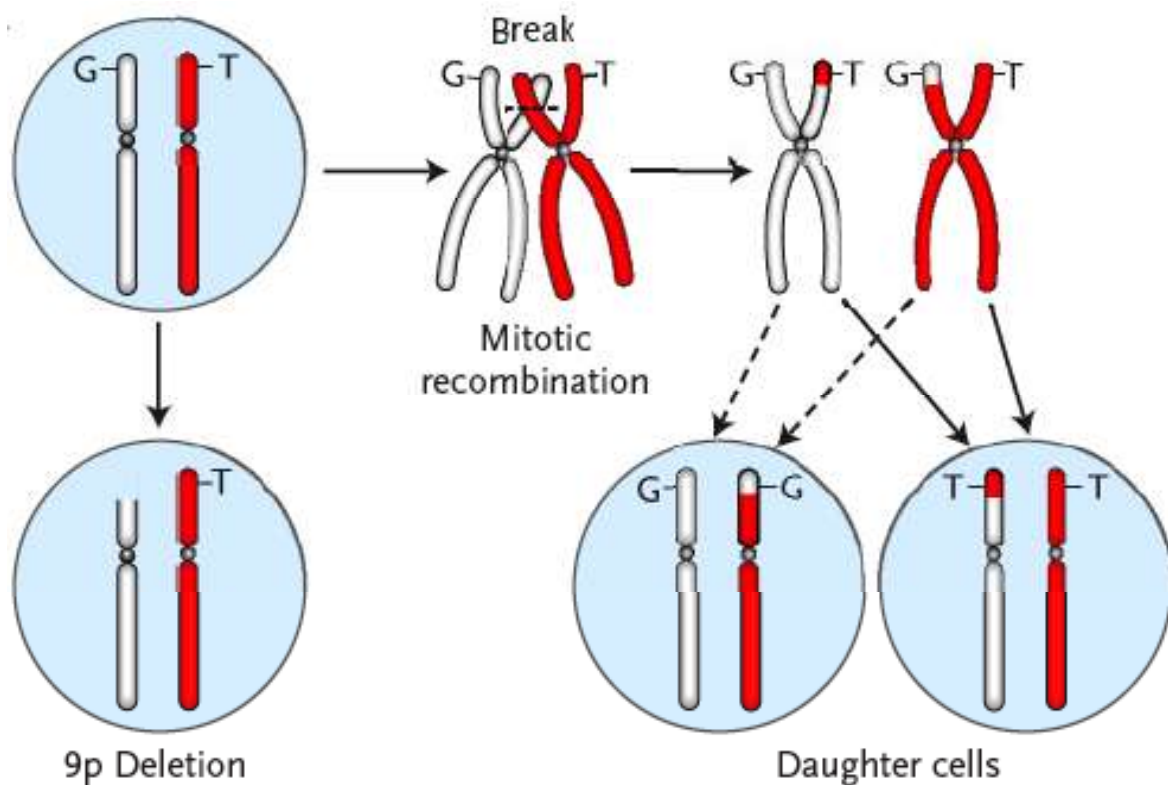


Figure 16 : Mécanisme de perte d'hétérozygotie par recombinaison homologue (Kralovics, Passamonti et al. 2005).

II. Cytokines et syndromes myéloprolifératifs.

Les cellules mononuclées de moelle osseuse, de patients atteints de PV et de TE, sont capables *in vitro* de produire des colonies en absence de sérum et de cytokines exogènes : colonies érythroïdes endogènes (CEE) et colonies mégacaryocytaires endogènes (CME). Cependant, les progéniteurs restent hypersensibles aux cytokines et semblent dépendre partiellement des cellules accessoires présentes dans la moelle osseuse (cellules du stroma, cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes...).

La Myélofibrose Primitive (MFP)

Nous commencerons par le cas de la myélofibrose primitive car c'est le syndrome myéloprolifératif dont le profil cytokinique a été le plus étudié. Une première étude publiée en 1992 (LeBousse-Kerdilès et al. Blood, 1992) s'appuie sur un modèle de MFP chez la souris induite par le virus MPSV (Myeloproliferative Sarcoma Virus). Cette étude a permis de mettre en évidence une augmentation d'IL-6, de G-CSF, d'IL-1 α et du M-CSF (= CSF-1) dans le sérum des souris ainsi que la production de TNF α par les cellules de la rate, le TNF α étant connu pour interférer avec les cytokines de l'hématopoïèse précoce. Une autre étude (LeBousse-Kerdilès et al. Blood, 1996) a montré que les progéniteurs CD34⁺ de patients atteints de MFP expriment moins de TGF β R II et au contraire surexpriment les récepteurs du b-FGF (b-FGFR I et II) et hyperproduisent le b-FGF; cette association d'évènements facilite l'expansion des progéniteurs hématopoïétiques en stimulant leur survie et leur prolifération mais aussi en diminuant les signaux de régulation négatifs.

La production de PDGF est également augmentée dans les mégacaryocytes de patients MFP. Le PDGF est issu des mégacaryocytes, il est impliqué dans la prolifération des fibroblastes en collaboration avec le TGF β et l'EGF également contenus dans les granules α des plaquettes. Le PDGF stimule également la production de collagène. Le TGF β 1 est lui aussi hyperproduit par les cellules du sang périphérique de la lignée mégacaryocytaire de patients atteints de MFP, il appartient, avec le b-FGF, à une famille de polypeptides multifonctionnels impliqués dans la croissance et la différenciation et sont produits à la fois par les cellules hématopoïétiques et les cellules stromales. Le TGF β 1 régule négativement le cycle cellulaire des progéniteurs CD34⁺ ; et est également produit par ces cellules, son effet peut être abrogé par le b-FGF. Le TGF β apparaît comme le facteur de croissance le plus

puissant dans la régulation de l'activité des gènes de la matrice extracellulaire (MEC) : augmentation de différents types de collagène (I, III, IV, V). Le b-FGF, quant à lui, agit en synergie avec l'IL-3, le SCF, et le GM-CSF sur les progéniteurs précoces et aussi sur les progéniteurs engagés (Granulo-monocytiques, érythroïdes et mégacaryocytaires) en présence d'Epo. Le b-FGF n'est pas sécrété par les mégacaryocytes car sa sécrétion est sous le contrôle d'un peptide signal. Il est excrété par exocytose, blessure sévère ou lyse de la cellule, or dans la MFP, les mégacaryocytes sont dysplasiques et nécrotiques. Castro-Malaspina a été le premier à évoquer le rôle critique des mégacaryocytes et d'un facteur de croissance produit par ces derniers et stockés dans les granules des plaquettes (Castro-Malaspina H. et al. New York : Alan R. Liss, Inc ; 1984). Son hypothèse était que, l'origine de la fibrose est la conséquence d'une association entre l'augmentation de collagène due au PDGF et la diminution de la dégradation du collagène par le PF-4.

Le VEGF est également augmenté dans le plasma de patients MFP. Il est aussi produit par les mégacaryocytes, sa production est régulée positivement par le PDGF, le b-FGF et le TGF β (Le Bousse Kerdiles et al pathol biol 2001 ; Musolino C et al Am J Haematol 2002 ; (Ho, Lasho et al. 2007).

Dans la myélofibrose primitive, il semblerait qu'une cascade d'évènements induisant la dérégulation de la production de cytokines pro-fibrotiques par les mégacaryocytes (VEGF, bFGF, TGF β , PDGF) soit impliquée dans le développement de la fibrose médullaire.

De plus, il a été mis en évidence un taux sérique élevé d'IL-8 chez les patients atteints de MFP. Cette élévation serait due en partie par une production accrue d'IL-8 par les plaquettes. Les progéniteurs CD34+, les cellules de la lignée granulo-monocytaire et les mégacaryocytes de patients produisent des taux d'IL-8 proches de ceux des cellules de sujets sains. Cependant, leur nombre élevé dans la MFP pourrait également contribuer à l'élévation du taux sérique d'IL-8. Dans la MFP, l'IL-8 serait impliquée dans la migration des progéniteurs CD34+ vers la rate et le foie. L'IL-8 jouerait aussi un rôle dans la maturation anormale des mégacaryocytes de patients MFP car en présence d'un anticorps dirigés contre ses récepteurs, la ploïdie des mégacaryocytes est restaurée. L'IL-8 étant également produite par les cellules endothéliales et les fibroblastes, son rôle potentiel dans la néoangiogenèse et la fibrose ne peut être exclu (Emadi, Clay et al. 2005).

La Thrombocythémie Essentielle (TE)

Les patients atteints de TE présentent un taux sérique de Tpo normal ou bas, et présentent un défaut de l'expression de c-MPL (le récepteur de la Tpo) incluant la diminution

du nombre de récepteur à la surface et une baisse de l'efficacité de la signalisation transmise par le récepteur.

Une étude publiée en 2002 a montré des taux plasmatiques élevés de VEGF dans la MFP, la PV et particulièrement dans la TE (Musolino C. et al., Am J of Hemato, 2002 ; (Ho, Lasho et al. 2007). Le VEGF était le plus augmenté chez les patients présentant des complications vasculaires. Le taux sérique de VEGF était corrélé au chiffre de plaquettes dans la TE, et est donc associé au risque de complications thrombotiques. Le b-FGF a également été trouvé augmenté dans le sérum de la TE, la PV et la MFP, mais il ne corrèle pas avec le chiffre de plaquettes dans la TE.

Pour le moment, peu d'études ont été conduites dans le domaine de la dérégulation des cytokines dans les SMP et notamment dans la thrombocythémie essentielle. Les mécanismes cytokiniques impliqués dans cette pathologie restent encore à étudier.

La Polyglobulie de Vaquez (PV)

Notre équipe a montré que des taux élevés d'IL-11 et d'IL-8 étaient présents dans le sérum, le plasma médullaire et le surnageant de cellules stromales de patients atteints de PV (Hermouet S. et al., Cytokines, 2002). L'IL-11 est connue pour stimuler l'érythropoïèse et la mégacaryocytopoïèse. Dans une autre étude, le plasma et le sérum de patients atteints de SMP (PV, TE, MFP) ont été testés sur des membranes permettant la détection de nombreuses cytokines (Musolino C. et al. Am J of Hematol, 2002). Cette étude a mis en évidence une élévation du taux de VEGF dans le plasma et du b-FGF dans le sérum des patients atteints de SMP dont certains cas de PV. Le VEGF est relargué par les plaquettes dont le taux est généralement augmenté dans la PV ; il active les cellules endothéliales et est impliqué dans le risque de complications thrombotiques. Le b-FGF agit également sur les cellules endothéliales et le stroma. Le stroma activé par le b-FGF produit des inducteurs de l'angiogénèse comme b-FGF (action autocrine), l'IL-6 et l'IL-8.

Ainsi, les études déjà conduites sur la dérégulation des cytokines et son rôle dans la pathogénèse de la PV ont permis de mettre en évidence l'implication d'au moins quatre molécules : l'IL-11, l'IL-8, le VEGF et le b-FGF. Cependant, il est possible que d'autres cytokines soient dérégulées et impliquées dans la pathogénèse de la PV. En effet, l'hypersensibilité des progéniteurs aux cytokines et leur capacité à produire des CEE *in vitro* n'est que partiellement régulée par l'IL-11 et l'IL-8.

La recherche d'autres facteurs potentiellement impliqués dans la pathogénèse de la PV est l'un des thèmes de recherche présentés.

PRESENTATION DU SUJET

Comme il a été décrit dans la première partie, la Polyglobulie de Vaquez est une maladie complexe dont la pathogénèse n'est pas encore totalement élucidée.

La découverte, en 2005, de la mutation V617F de la tyrosine kinase JAK2 et les différences en terme d'expression chez les patients atteints de SMP, nous ont amenés dans un premier temps à vouloir déterminer avec précision la fréquence et le niveau d'expression de la mutation chez les patients au diagnostic. Nous avons, donc, pour ce faire, développé une technique de PCR quantitative spécifique de l'allèle V617F (AS-qPCR). Dans la mesure où la détection de la mutation V617F se présente comme un outil d'aide au diagnostic fiable de la PV et la TE, nous avons ensuite voulu savoir si l'utilisation de notre technique d'AS-qPCR permettait la mise en évidence d'un SMP dans des cas atypiques tels que les anémies réfractaires sidéroblastiques (ARS) à taux de plaquettes élevé ou les thromboses digestives profondes. Enfin, nous avons étudié, dans le cadre d'un travail collaboratif, la fréquence de la mutation JAK2V617F dans des cas de transformation en leucémie aigue myéloïde (LAM) chez des patients initialement atteints de SMP. Les résultats de ces études sont présentés dans la première partie des « Résultats ».

Cependant, la présence de la mutation JAK2V617F n'est pas spécifique d'un SMP particulier et son niveau d'expression est très variable dans la PV. La tyrosine kinase JAK2 est un élément crucial de la signalisation induite par les cytokines hématopoïétiques, dont de nombreuses études ont mis en évidence une dérégulation de production dans la MFP, la TE mais aussi la PV. De fait une étude, réalisée dans notre équipe, a permis de mettre en évidence une augmentation d'IL-11 et d'IL-8 dans le sérum, le plasma médullaire et les surnageants de culture de cellules stromales de patients atteints de PV (Hermouet, Godard et al. 2002). Tous ces résultats nous ont incité à rechercher d'autres cytokines et facteurs dont la signalisation est liée de façon directe ou indirecte à la voie JAK/STAT et dont l'expression pourrait être dérégulée dans la PV. Les résultats obtenus concernant cette étude seront présentés dans la deuxième partie des « Résultats ».

RESULTATS

I. Etude de la mutation JAK2 V617F dans les SMP.

Etude de la fréquence de la mutation JAK2V617F au diagnostic chez des patients atteints de PV et de TE.

1. Lippert E, Boissinot M et coll. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. Blood 2006 ; 108 :1865.

i. Introduction

De nombreuses études ont été réalisées depuis la découverte de la présence de la mutation JAK2V617F dans les SMP négatifs pour le chromosome de philadelphie. La plupart de ces études s'accordent sur la forte présence de la mutation (90%) chez les patients atteints de PV, mais les résultats de ces études varient concernant la TE. Ces divergences sont potentiellement dues aux critères de diagnostic choisis, aux types de matériels cellulaires analysés, à la sensibilité de la technique de détection utilisée mais aussi et surtout au fait que toutes les études antérieures ont été réalisées chez des patients traités.

Notre projet était donc de mettre au point une technique de détection fiable et sensible de PCR quantitative spécifique d'allèle, utilisable à la fois sur l'ADN génomique et sur l'ADN complémentaire, qui nous permettrait de déterminer la fréquence de la mutation JAK2V617F et la quantification de son niveau d'expression. Nous avons ainsi étudié le taux d'expression, au niveau de l'ARN messager, des formes sauvage et mutée de JAK2 dans les granulocytes d'une cohorte de patients comprenant 60 TE et 62 PV au diagnostic en comparaison avec une cohorte contrôle comprenant 24 polyglobulies secondaires, 28 érythrocytoses pures et 24 thrombocytozes réactionnelles. Nous avons également étudié une série de contrôles composée de 40 donneurs sains et de 18 patients pré-opératoires. Les diagnostics ont été établis selon les critères de l'OMS : taux d'hémoglobine et hématocrit augmentés, absence de cause de polyglobulie secondaire et taux d'Epo sérique bas. En plus de ces critères conventionnels, les diagnostics ont été réalisés par des tests de formation de colonies endogènes érythroïdes et mégacaryocytaires, des dosages d'Epo et la RT-qPCR de détection de PRV-1.

Brief report

The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera

Eric Lippert, Marjorie Boissinot, Robert Kralovics, François Girodon, Irène Dobo, Vincent Praloran, Nathalie Boiret-Dupré, Radek C. Skoda, and Sylvie Hermouet

We determined the allelic frequency of the JAK2-V617F mutation in DNA and assessed the expression levels of the mutant and wild-type JAK2 mRNA in granulocytes from 60 patients with essential thrombocythemia (ET) and 62 patients with polycythemia vera (PV) at the time of diagnosis. Using allele-specific quantitative polymerase chain reaction (qPCR), we detected JAK2-V617F in 75% of ET

and 97% of PV at diagnosis. The total JAK2 mRNA levels were elevated in ET, PV, and secondary and idiopathic erythrocytosis, suggesting that hyperactive hematopoiesis alters JAK2 expression. The expression levels of JAK2-V617F mRNA were variable but strongly correlated with the allelic ratio of JAK2-V617F determined in DNA. Thus, differences in JAK2-V617F expression, markedly lower in ET

than in PV, reflected different percentages of granulocytes carrying the mutation. Moreover, allelic ratios higher than 50% JAK2-V617F, indicating the presence of granulocytes homozygous for JAK2-V617F, were found in 70% of PV at diagnosis but never in ET. (Blood. 2006;108:1865-1867)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

Since the discovery of the JAK2-V617F mutation in BCR-ABL-negative myeloproliferative disorders (MPDs),¹⁻⁴ several cohorts of patients were studied. Most reports agreed on the presence of JAK2-V617F in a large majority of polycythemia vera (PV), but the rate of positivity in essential thrombocythemia (ET) varied.¹⁻⁸ Among the reasons for such differences are ET heterogeneity (patients were often treated), the criteria used for diagnosis, the type of cellular material studied, and the sensitivity of the techniques, allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) revealing more mutations than sequencing or restriction fragment analysis. This prompted us to develop a sensitive, quantitative AS-PCR (AS-qPCR), which we used to examine patients addressed for diagnosis of polycythemia or thrombocytosis.

The collagen endogenous colony assays and EPO dosage were described previously.⁹⁻¹² Blood granulocytes were isolated from the lower interface of a Ficoll density gradient, then submitted to erythrocyte lysis. RNA or genomic DNA was extracted with Trizol (Invitrogen, Frederick, MD) or QiaAmp DNA mini-kit (Qiagen, Valencia, CA); the latter was also used for cells stained with May-Grünwald-Giemsa. The quantitative reverse-transcriptase (RT)-PCR assay of PRV-1 expression was performed as described.^{13,14}

JAK2 AS-qPCRs and RT-qPCRs were performed with specific forward primers (wild-type JAK2 [JAK2-WT]: 5'-GCGCGGTTTAAATTATGGAGTATGTG-3'; JAK2-V617F: 5'-GCGCGGTTTAAATTATGGAGTATGTT-3'), common reverse primers (cDNA: 5'-CCGCTTTTCAGATATGTAATCTAGTGATCC-3'; DNA: 5'-GCGGTGATCTGAACTGAATTTTC-3'), and 6-FAM probes (cDNA: 5'-TGGAGACGAGAATAATCTGGTTCAGGAGTTTG-3'; DNA: 5'-TGGAGACGAGAGTAAGTAAACTACAGGCT-3'). Copy numbers were determined by comparison with serial dilutions of plasmids obtained by cloning of JAK2 and ABL cDNA or DNA amplicons from U937 (WT) and HEL (V617F) cells into TOPO-TA vectors (Invitrogen).

Study design

With informed consent and before treatment, blood and bone marrow (BM) samples from 62 PV and 60 ET, as well as 76 controls (24 secondary erythrocytosis [SE], 28 idiopathic erythrocytosis [IE], 24 reactive thrombocytosis), were collected in 5 centers. Blood was also obtained from 40 healthy donors (HDs) and 18 patients hospitalized for minor surgery. The study was approved by local Comité Consultatif de Protection des Personnes dans le Recherche Biomedicale de Bourgogne ethics committees.

Results and discussion

Patient characteristics and frequency of JAK2-V617F in ET and PV at diagnosis

Patients with erythrocytosis or thrombocytosis were diagnosed with PV, SE, ET, or RT according to Polycythemia Vera Study

From the Laboratoire d'Hématologie du CHU de Bordeaux, France; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 601 (U601), Nantes, France; the Department of Research, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Switzerland; Laboratoire d'Hématologie du CHU de Dijon, France; Laboratoire d'Hématologie du CHU d'Angers, France; Laboratoire d'Hématologie du CHU de Clermont-Ferrand, France; and Laboratoire d'Hématologie du CHU de Nantes, France.

Submitted January 24, 2006; accepted May 8, 2006. Prepublished online as Blood First Edition Paper, May 25, 2006; DOI 10.1182/blood-2006-01-013540.

Supported by grants from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique of the Région Bourgogne and the Grand Ouest and Aquitaine committees of the Ligue Nationale contre le Cancer.

S.H. and R.C.S. conceived the study; E.L. and S.H. performed qPCRs and qRT-PCRs, analyzed the data, did statistical analyses, and wrote the paper; M.B. and R.K. performed qPCRs, qRT-PCRs, and sequencing; F.G., I.D., V.P., and N.B.-D. provided samples and acquired clinical and biologic data; and F.G. is responsible for the patient database.

Reprints: Sylvie Hermouet, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes cedex, France; e-mail: sylvie.hermouet@chu-nantes.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

Table 1.
Classification of ET and PV according to JAK2-V617F expression levels

	ET JAK2-V617F status				PV JAK2-V617F status			
	Negative (P)	All positive (P)	Less than 25% (P)	25% to 40% (P)	25% to 40% (P)	41% to 74% (P)	75% or more (P)	All positive
No. of patients	17	42	31	11	12	26	20	58
JAK2-WT/100 ABL	408 ± 421	377 ± 373	306 ± 282	600 ± 549 (.028*)	459 ± 323	316 ± 274	148 ± 130	289 ± 266
Total JAK2/100 ABL	408 ± 421	495 ± 533	363 ± 338	896 ± 837 (.005*)	700 ± 514 (.947†)	764 ± 614	1120 ± 773	857 ± 666
Leukocyte count, × 10 ⁹ /L	9.4 ± 3.0 (.029‡)	10.4 ± 3.7 (.327‡)	9.7 ± 3.2 (.025†)	12.7 ± 4.6	11.2 ± 4.4 (.510†)	10.3 ± 2.0	16.2 ± 5.2	12.0 ± 4.6
Hematocrit	0.39 ± 0.05	0.42 ± 0.04 (.015‡)	0.42 ± 0.04 (.013‡)	0.42 ± 0.05 (.132‡)	0.55 ± 0.05 (.001†)	0.58 ± 0.5	0.60 ± 0.04 (.033§)	0.58 ± 0.05
Hemoglobin level, g/L	131 ± 14	140 ± 15 (.038‡)	140 ± 15 (.048‡)	142 ± 18	179 ± 19 (.001†)	184 ± 18	193 ± 16 (.033§)	186 ± 18
Platelet count, × 10 ⁹ /L	977 ± 347	785 ± 198 (.010‡)	759 ± 228 (.012‡)	797 ± 200	475 ± 226 (.003†)	515 ± 175	400 ± 187	466 ± 197
% positive for EEC	6	33	32	36	91 (.016†)	84	89	91
% positive for EMC	60	93 (.007<†)	93 (.017<†)	90	70	57	64	63

Plus-minus values indicate mean ± SD.

* Compared with ET with less than 25% JAK2-V617F.

† Compared with ET with 25% to 40% JAK2-V617F.

‡ Compared with negative ET.

§ Compared with PV with 25% to 40% JAK2-V617F, Mann-Whitney rank sum test.

|| Compared with negative ET, Fisher exact test. A P value less than .05 was considered statistically significant.

Group (PVSG) or World Health Organization (WHO) criteria.¹⁵⁻¹⁷ Patients with absolute erythrocytosis, no PV criteria, and no cause of SE were diagnosed with IE. At diagnosis, ET was characterized by endogenous megakaryocytic colonies (EMCs) (47/56 patients) and PV by low serum EPO (54/58 patients), increased PRV-1 expression (48/62), endogenous erythroid colonies (EECs) (50/59), and EMCs (30/49) (Figure 1). A minority of ET presented with increased PRV-1 (17/60), EECs (13/59), or low EPO (7/38); all had normal hematocrit or red cell mass, eliminating misdiagnosed PV.

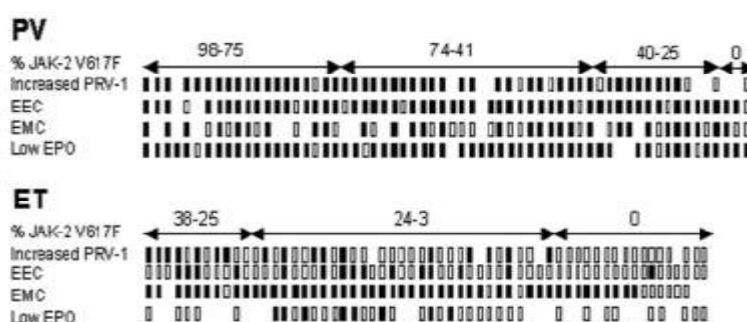
In granulocyte cDNA, JAK2-V617F was never found in IE, SE, and RT, or in healthy donors and presurgery patients, but was present in 43 of 60 ET and 59 of 62 PV (Figure 1). In addition, the mutation was found in DNA from May-Grünwald-Giemsa-stained progenitors (1 BM smear and 2 EMCs) for 3 patients considered negative in granulocytes, raising the percentages of JAK2-V617F positivity to 75% (45/60) in ET and 97% (60/62) in PV. The high frequency of JAK2-V617F positivity in our ET series may be explained by the purity of the granulocyte preparations, the fact that diagnosis was established on the presence of EMCs (not a WHO criterion), in addition to BM histology, but mostly by the sensitivity (0.5%) of the qPCR. Indeed, using a different AS-qPCR, Levine et al detected a similar frequency of JAK2-V617F positivity in ET. Of note, the frequency of JAK2-V617F positivity in PV and ET is as high at diagnosis (this series) as after years of disease progression.^{1-8,18} Hence, detection of JAK2-V617F is an essential diagnostic test for both ET and PV. For the diagnosis of ET, the EMC assay is more sensitive than the detection of JAK2-V617F; it also allows molecular studies of EMCs, more likely to bear the mutation than unselected blood or BM cells.

Expression levels of JAK2-WT and JAK2-V617F mRNA in granulocytes

Relative expression of JAK2-WT and JAK2-V617F was quantitated against plasmidic standard dilutions and normalized for ABL expression. Granulocytes of IE and SE patients expressed significantly higher levels of JAK2-WT (medians: 348 and 452 JAK2-WT/100 ABL, $P = .001$ and $P = .005$, respectively) than healthy donors and presurgery patients (197 and 174 copies/100 ABL, respectively). When both JAK2-WT and JAK2-V617F were considered, PV and ET granulocytes also expressed significantly more total JAK2 than healthy donors and presurgery patients (median total JAK2/100 ABL: 680 in PV, $P < .001$; 303 in ET, $P = .008$), suggesting that chronic stimulation of hematopoiesis may up-regulate JAK2 expression.

The percentage of total JAK2 represented by JAK2-V617F (%V617F) in ET and in PV was then analyzed (Figure 1; Table 1). This percentage can be assimilated to the allelic ratio since %V617F was similar when assessed in cDNA and in genomic DNA from granulocytes of 40 patients ($r = 0.90$, $P < .01$; [%V617F in cDNA] = $1.03 \times$ [%V617F in genomic DNA]). The percentages of mutant were not close to 50 or 100 as would be the case if all cells were exclusively heterozygous or homozygous for the mutant allele. Rather, they were distributed continuously, as if fractions of granulocytes had different allelic status. Thus, a percentage of mutants more than 50 is necessary and sufficient to affirm homozygosity. In positive PV, JAK2-V617F represented on average 62% of total JAK2 (median: 61%; range: 8%-98%). In all but one positive PV, JAK2-V617F represented more than 25% of total JAK2. Seventy percent of PV expressed more than 50% JAK2-V617F, implying that at least part of the granulocytes was homozygous for the V617F allele. In contrast, JAK2-V617F represented an average of 20% of total JAK2 in ET ($P < .001$

Figure 1. Characteristics of ET and PV patients at diagnosis. Expression of JAK2-V617F and results of the PRV-1 assay, endogenous erythroid colony (EEC) and endogenous megakaryocytic colony (EMC) assays, and dosage of serum EPO are shown according to the percentage of total JAK2 represented by JAK2-V617F in blood granulocyte cDNAs. Filled rectangles show increased expression of PRV-1 (defined by a PRV-1 CT/ABL CT ratio < 0.850), positive EEC and EMC assays, and low (< 3.3 IU/L) serum EPO; open rectangles, normal PRV-1 expression, negative EEC and EMC assays, and normal or high serum EPO. Empty spaces mean that the assay was not performed.



compared with PV), and all but one positive ET expressed less than 40% JAK2-V617F (median: 19%; range: 3%-50%). Thus, the 50% JAK2-V617F threshold revealed more "homozygous" PV at diagnosis than previously reported using sequencing and nonquantitative PCR.¹⁻⁵ In ET, either the mechanisms leading to JAK2-V617F homozygosity do not exist, or homozygous clones are repressed.

Effects of JAK2-V617F levels on hematopoietic lineages and disease phenotype

Percentages of JAK2-V617F correlated with granulocyte expression of PRV-1 ($n = 92$, $r = 0.543$, $P < .001$), confirming PRV-1 expression as a target of JAK2 signaling.¹⁹ In patients at diagnosis, JAK2-V617F levels correlated only with leukocyte counts (PV: $n = 56$, $r = 0.496$, $P = .001$; ET: $n = 42$, $r = 0.314$, $P = .043$), not with hemoglobin level, hematocrit level, platelet counts, numbers of EECs, or numbers of EMCs. Consistently, the level of mutant expression was not sufficient per se to determine PV or ET phenotype: comparison of PV and ET with similar levels of mutant (25%-40%) showed similar leukocyte counts, but PV patients had significantly higher EPO, EEC formation, red cell mass (152% vs 78%, $P = .001$), hematocrit, and hemoglobin level and lower platelet counts (Table 1). However, as recently described for ET,⁸ in our series of PV and ET at diagnosis, JAK2-V617F was associated

with stimulation of erythropoiesis and repression of thrombopoiesis: PV with 75% or more mutant and positive ET differed from other PV and negative ET by higher hematocrit and hemoglobin levels, but lower platelet counts (Table 1).

In summary, sensitive qPCRs detected JAK2-V617F in 97% of PV and 75% of ET at diagnosis, with higher levels of expression in PV than in ET; cells homozygous for the mutation were present in 70% of PV. This demonstrates the interest of precise and sensitive assessment of JAK2-V617F for the diagnosis of MPD.

Acknowledgments

We wish to thank Prof James Casey (Cornell University, Ithaca, NY) and Dr François Davodeau (INSERM, U601, Nantes, France) for helpful discussions; Dr Céline Schaeffer for collecting patient data; and Mrs Danielle Pineau and Marina Migeon for excellent technical help. We are indebted to colleagues from the Departments of Clinical Hematology of the Centres Hospitaliers of Angers, Bayonne, Bordeaux, Chalon-sur-Saône, Clermont-Ferrand, Dax, Dijon, Laval, Libourne, Lorient, Nantes, La Roche-sur-Yon, and Saumur for providing samples.

References

- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434:1144-1148.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Cancer Genome Project: acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054-1061.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
- Cazzola M, Skoda RC. Gain of function, loss of control: a molecular basis for chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2005;90:871-874.
- Goerttler PS, Steimle C, März E, et al. The JAK2 V617F mutation, PRV-1 overexpression, and EEC formation define a similar cohort of MPD patients. *Blood*. 2005;106:2862-2864.
- Teffleri A, Sirhan S, Lasho TL, et al. Concomitant neutrophil JAK2 mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythemia. *Br J Haematol*. 2005;131:166-171.
- Campbell PJ, Scott LM, Buck G, et al. Definition of subtypes of essential thrombocythemia and relation to polycythemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*. 2005;366:1945-1953.
- Dobo I, Boiret N, Lippert E, et al. A standardized endogenous megakaryocytic/erythroid (EMC/EEC) colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2004;89:1203-1208.
- Dobo I, Donnard M, Girodon F, et al. Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assay performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol J*. 2004;5:161-167.
- Dobo I, Mossuz P, Campos L, et al. Comparison of four serum-free, cytokine-free media for the analysis of endogenous erythroid colony (EEC) growth in polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET). *Hematol J*. 2001;2:396-403.
- Mossuz P, Girodon F, Donnard M, et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*. 2004;89:1194-1198.
- Klippel S, Strunk E, Temerinac S, et al. Quantification of PRV-1 mRNA distinguishes polycythemia vera from secondary erythrocytosis. *Blood*. 2003;102:3569-3574.
- Beillard E, Pallisgaard N, Van Der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR): a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2474-2486.
- Michiels JJ, Juvonen E. Proposal for revised diagnostic criteria of essential thrombocythemia and polycythemia vera by the Thrombocythemia Vera Study Group. *Semin Thromb Hemostasis*. 1997;23:339-347.
- Pierre R, Imbert M, Thiele J, et al. Chronic myeloproliferative diseases. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2001:15-44.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-2302.
- Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, et al. X-inactivation based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveals a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. *Blood*. 2006;107:4139-4141.
- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood*. 2005;106:3374-3376.

II. Conclusion et commentaires

Cette étude a permis de confirmer la présence de la mutation JAK2V617F au diagnostic des SMP et donc l'importance de sa détection dans l'établissement du diagnostic. Nous retrouvons bien la mutation dans >90% des PV de notre cohorte, et la sensibilité de notre technique permet de détecter la mutation dans une plus grande proportion de TE (70% contre environ 50% dans les autres études).

Par ailleurs, nous avons observé que des patients atteints de PV ou de TE peuvent présenter des taux de JAK2V617F similaire (de 25% à 40%), mais des numérations globulaires, des profils de formation de colonies endogènes et des taux d'Epo sériques différents. La présence de la mutation et son niveau d'expression ne suffisent donc pas expliquer le phénotype de la maladie.

La PV étant considérée comme une maladie clonale, le fait que certains patients expriment des taux de JAK2V617F inférieurs à 30% suggère que seule une partie des cellules du clone SMP est mutée. Ces résultats ont été corroborés par une autre étude en 2006 (Kralovics, Teo et al. 2006), qui a démontré, par des études de clonalité, que chez certains patients, seule une proportion du clone SMP est porteur de la mutation. Par conséquent, la mutation JAK2V617F peut être considérée comme un événement secondaire dans la mise en place du SMP au moins pour une partie des patients.

Importance de la détection de la mutation JAK2V617F dans le diagnostic d'un SMP latent.

- i. Etude de cas d'anémies réfractaires sidéroblastiques à taux de plaquettes élevé.

2. Boissinot M et coll. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS). Blood 2006 ; 108 : 1781.

a) Introduction

L'anémie réfractaire sidéroblastique (ARS) est un syndrome myélodysplasique caractérisé par une anémie dans laquelle au moins 15% des érythroblastes de la moelle osseuse sont des sidéroblastes. Dans 10 à 20% des cas, les patients présentent un taux de plaquettes élevé ($> 500 \times 10^9/L$). Cette élévation du taux de plaquettes peut être due soit à une thrombocytose réactionnelle, soit à un syndrome myéloprolifératif. La mutation JAK2V617F est présente dans 90% des PV et 70% des TE. Des analyses par séquençage ont déjà mis en évidence la présence de la mutation dans 5% des syndromes myélodysplasiques dont 4% d'ARS (Steensma, Dewald et al. 2005).

Le but de cette étude a donc été d'évaluer la présence de la mutation JAK2V617F chez des patients présentant une ARS et une thrombocytose (ARS-T).

Nous avons utilisé la technique de PCR quantitative allèle-spécifique (AS-qPCR) récemment mise au point par notre équipe, qui permet une détection sensible jusqu'à 0,5% de mutant dans l'ADN issus de patients. L'étude est rétrospective, elle regroupe une cohorte de 16 patients atteints d'ARS entre 1986 et 2005 chez lesquels une thrombocytose a été observée. L'ADN génomique a été extrait à partir des granulocytes pour 2 patients et à partir de cellules fixées (myélogramme) pour les 14 patients restants. Les échantillons avaient été collectés au moment du diagnostic de la thrombocytose.

QuickTime™ et un
décompresseur TIFF (LZW)
sont requis pour visionner cette image.

Figure 17: Sidérobastes en couronne (photo donnée par le Dr Richard Garand)

To the editor:

The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS)

Refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) is a myelodysplastic syndrome characterized by an anemia in which at least 15% of bone marrow erythroblasts are ringed sideroblasts. A percentage of RARS patients (10%-20%) eventually present high platelet counts ($> 500 \times 10^9/L$), which may be due to reactive thrombocytosis or secondary myeloproliferative disorder (MPD).¹⁻³ The recently discovered V617F mutation of tyrosine-kinase JAK2 (JAK2-V617F),⁴ specific to MPD except chronic myeloid leukemia, is present in 98% of polycythemia vera and 70% of essential thrombocythemia (ET). By sequencing, the JAK2-V617F mutation has also been detected in 5% of myelodysplastic syndromes (4% of RARS).⁵ To investigate the presence of JAK2-V617F and MPD in patients with RARS and thrombocytosis (RARS-T), we used an allele-specific, sensitive quantitative PCR recently developed that detects 0.5% of JAK2-V617F.⁶

Sixteen patients diagnosed with RARS over a period of 20 years (1986-2005) and who subsequently presented with thrombocytosis were examined. Genomic DNA was prepared from blood granulocytes (2 patients) or stained bone marrow smears (14 patients) collected at the time of thrombocytosis. Quantitative PCRs were performed with forward primers 5'-GCGCGTTTAAATTATGGAGTATGTG-3' (wild-type JAK2) and 5'-GCGCGTTTAAATTATGGAGTATGTG-3' (JAK2-V617F), reverse primer 5'-GCGGTGATCCTGAACTGAATTTTC-3' and 6-FAM probe 5'-TGGAGACGAGAGTAAGTAACTA-CAGGCT-3' as described elsewhere.⁶ Wild-type JAK2 was amplified successfully for the 16 patients; JAK2-V617F was amplified for 5 patients. As observed in ET,⁶ the level of

expression of JAK2-V617F was less than 40% of total JAK2 (median, 16%; range, 4%-35%). For 1 patient, JAK2-V617F was also amplified from a bone marrow smear performed 5 years earlier, at a time when platelet counts were normal.

A bone marrow biopsy was performed for 10 patients: histology was in favor of ET for 7 patients (4 positive for JAK2-V617F, 3 without the mutation) (Table 1); for the fifth patient carrying the mutation, no biopsy was performed. Altogether, 8 of the 16 patients with RARS-T could be diagnosed with ET either according to the World Health Organization criteria or because they carried the JAK2-V617F mutation, or both. Patients with RARS-T diagnosed with ET differed from other patients by a lower percentage of sideroblasts and higher platelet counts (Table 1). In this limited series, expression of JAK2-V617F did not affect blood cell counts and was not associated with myelofibrosis,⁷ observed for only 1 patient (negative for the mutation). Last, the collagen assay of endogenous colony formation, which allows easy identification of megakaryocytic colonies (Figure 1) and is positive in 85% of ET,⁸ including those negative for JAK2-V617F,⁶ was performed for 4 of the 5 JAK2-V617F-positive patients. Endogenous colony assays were negative for the 4 patients; moreover, cell death was common in erythroid colonies grown in the presence of cytokines, which is not observed in ET but typical of myelodysplastic syndromes (Figure 1).

In summary, 50% of RARS patients with high platelet counts presented ET features; 31% carried the JAK2-V617F mutation. ET secondary to RARS differs from primary ET by the absence of formation of endogenous colonies.

Table 1. Comparison of RARS-T patients according to diagnosis of ET and expression of JAK2-V617F

	All patients		Patients with ET features	
	No evidence of ET, n = 8	ET features, n = 8	JAK2-V617F negative, n = 3	JAK2-V617F positive, n = 5
BM histology in favor of ET	0/3	7/7	3/3	4/4
Male/female	5/3	4/4	2/1	2/3
Age				
Mean $\pm$ SD	78 $\pm$ 6	74 $\pm$ 8	72 $\pm$ 6	74 $\pm$ 10
Median (range)	79 (68-88)	73 (59-85)	71 (67-79)	74 (59-85)
Sideroblasts, %				
Mean $\pm$ SD	69 $\pm$ 15	35* $\pm$ 11	38 $\pm$ 2	33 $\pm$ 14
Median (range)	70 (44-91)	37 (15-50)	38 (36-40)	30 (15-50)
Hemoglobin, g/L				
Mean $\pm$ SD	98 $\pm$ 11	96 $\pm$ 20	102 $\pm$ 26	93 $\pm$ 17
Median (range)	100 (75-115)	88 (75-133)	88 (86-133)	88 (75-120)
Platelets, $\times 10^9/L$				
Mean $\pm$ SD	623 $\pm$ 170	957† $\pm$ 346	966 $\pm$ 385	951 $\pm$ 367
Median (range)	563 (450-880)	943 (546-1478)	928 (600-1369)	958 (546-1478)
Leukocytes, $\times 10^9/L$				
Mean $\pm$ SD	8.5 $\pm$ 2.9	11.4 $\pm$ 3.7	9.7 $\pm$ 2.2	12.4 $\pm$ 4.2
Median (range)	8.0 (5.3-13.6)	10.9 (7.4-17.5)	10.0 (7.4-11.8)	12.9 (8.0-17.5)

Characteristics of RARS patients with thrombocytosis (RARS-T) were first analyzed depending on whether ET features had been established (by bone marrow histology [7 patients] and/or presence of the JAK2-V617F mutation [5 patients]) or not (absence of JAK2-V617F and bone marrow histology not in favor of ET, or not available). Then RARS-T patients with ET features were compared according to the presence of JAK2-V617F.

* $P < .001$ and † $P = .028$, compared to patients with no evidence of ET, by Student *t* test.

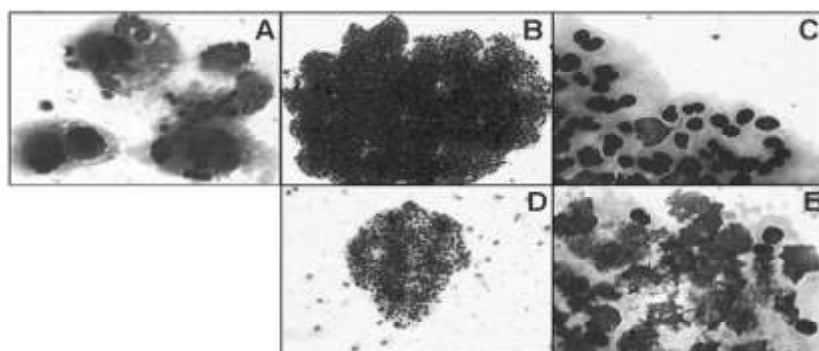


Figure 1. Typical colonies observed in ET and in RARS with ET features. Colonies are shown after May-Grünwald-Giemsa staining of collagen gels and are typical of ET (A-C) or of RARS with ET features (D-E). (A) Endogenous megakaryocytic colony, grown without serum or cytokine. (B,D) Erythroid colonies grown in the presence of cytokines; note the small size of the RARS colony (D). (C) Detail of erythroblasts of the colony shown in panel B. (E) Detail of erythroblasts of the colony shown in panel D; note extensive cell death. Images were obtained using a Leica microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a $10\times/0.80$ numeric aperture (NA) (A,B,D) or a $100\times/0.80$ NA (C,E) objective. Images were acquired using a Sony Power HAD DXC-950P camera (Sony, Tokyo, Japan) and Tribun ICS/Thunder 17 acquisition software. Images were processed using Microsoft PowerPoint 2000 (Microsoft, Redmond, WA).

Marjorie Boissinot, Richard Garand, Mohamed Hamidou, and Sylvie Hermouet

Correspondence: Sylvie Hermouet, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes cedex, France; e-mail: sylvie.hermouet@chu-nantes.fr.

Supported by a grant from the Délégation Régionale à la Recherche Clinique of the Région Pays de Loire and the CHU de Nantes.

References

1. Brunning RD, Bennett JM, Flandrin G, Matutes E. Refractory anaemia with ring sideroblasts. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours: Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001:69.
2. Schmitt-Graeff A, Thiele J, Zuk I, Kvasnicka HM. Essential thrombocythemia with ringed sideroblasts: a heterogeneous spectrum of diseases, but not a distinct entity. *Haematologica*. 2002;87:392-399.
3. Shaw GR. Ringed sideroblasts with thrombocytosis: an uncommon mixed myelodysplastic/myeloproliferative disease of older adults. *Br J Haematol*. 2005;131:180-184.
4. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
5. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005;106:1207-1209.
6. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. Prepublished on May 25, 2006, as DOI 10.1182/blood-2006-01-013540.
7. Ohgishiki K, Aota Y, Akahane D, et al. The JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in myelodysplastic syndromes (MDS) developing myelofibrosis indicates the myeloproliferative nature in a subset of MDS patients. *Leukemia*. 2005;19:2359-2360.
8. Dobo I, Boiret N, Lippert E, et al. A standardized endogenous megakaryocytic/erythroid (EMC/EEC) colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2004;89:1203-1208.

b) Conclusion et commentaires

Nous avons démontré que la détection de la mutation JAK2V617F par une technique sensible, en association avec la biopsie ostéomédullaire, est un outil utile au diagnostic d'une TE atypique dans les cas ARS-T. Les patients ainsi diagnostiqués ARS-TE se distinguent des autres ARS-T par un pourcentage de sidéroblastes inférieur et un taux de plaquettes plus élevé. De plus, lors des tests de formation de colonies endogènes, la TE secondaire à une ARS-T se démarque de la TE classique par l'absence de CFU-Mk endogènes et une apoptose importante dans les cultures contrôles en présence de cytokines.

Ces résultats ont été confirmés ultérieurement par deux études (Szpurka, Tiu et al. 2006; Schmitt-Graeff, Teo et al. 2008).

ii. Etude de cas de thromboses digestives profondes

3. Boissinot M, Lippert et coll. Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation in patients with splanchnic vein thrombosis and normal or low hematocrit and platelet counts. Blood 2006 ; 108 : 3223.

a) Introduction

Les thromboses du système porte hépatique ou thrombose porte splanchnique (TPS) sont l'une des complications des SMP mais elles peuvent aussi parfois dissimuler un SMP latent. L'érythrocytose et la thrombocytose pouvant être masquées par l'hémodilution et/ou la splénomégalie, ce qui rend leur diagnostic difficile.

Cette étude, à l'instar de celle réalisée sur les ARS-T, est rétrospective. Elle comporte une cohorte de 45 patients diagnostiqués TPS par Doppler et scanner multibarrettes. La particularité de cette étude est que les patients présentaient tous un hémocrite et un taux de plaquettes normaux ou bas.

Dans le but de mettre en évidence la présence d'un SMP chez ces patients, nous avons utilisé deux tests révélant des caractéristiques spécifiques des SMP : l'AS-qPCR pour la détection de la mutation JAK2V617F et le test de pousse de colonies endogènes érythrocytaires et mégacaryocytaires. L'AS-qPCR a été réalisée à partir d'ADNc extrait de PNN du sang (37 patients) et/ou d'ADN extrait de colonies myéloïdes colorées au May-Grünwald-Giemsa (11 patients). Le test de pousse de colonies endogènes, le dosage sérique de l'Epo ainsi que le niveau d'expression du gène PRV-1 dans les granulocytes de patients ont été réalisés dans le cadre de l'établissement du diagnostic.

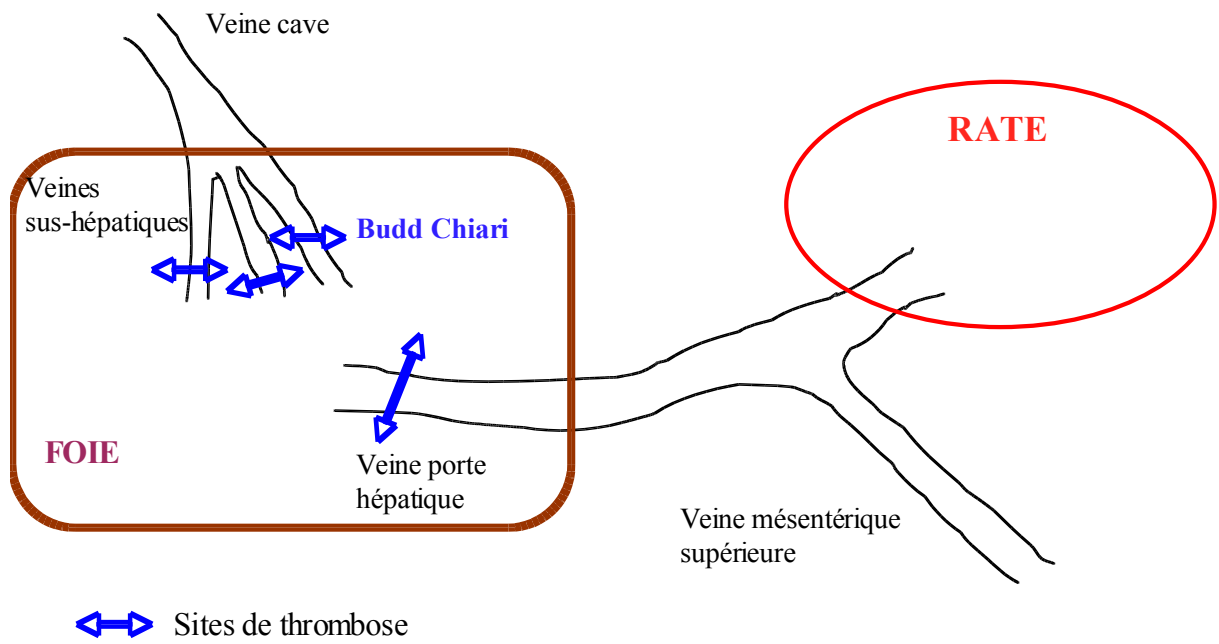


Figure 18: Schéma des sites de thromboses hépatiques profondes.

To the editor:

Latent myeloproliferative disorder revealed by the JAK2-V617F mutation and endogenous megakaryocytic colonies in patients with splanchnic vein thrombosis

Splanchnic vein thrombosis (SVT), a complication of myeloproliferative disorders (MPDs), sometimes reveals polycythemia vera (PV) or essential thrombocythemia (ET).¹ However, polycythemia and thrombocytosis may be masked by hemodilution and/or hypersplenism in SVT patients, making the diagnosis of MPD difficult. In this retrospective study, SVT was diagnosed by Doppler ultrasound and/or multidetector spiral computed tomography for 45 patients with normal or low hematocrit and platelet counts. These patients were examined for the presence of 2 clonal markers specific for MPDs: the JAK2-V617F mutation² and the capacity to form endogenous erythroid colonies (EECs) and/or endogenous megakaryocytic colonies (EMCs), observed in both mutated and nonmutated MPDs (Table 1).³⁻⁵ Levels of expression of JAK2 wild-type (WT) or mutated (V617F) were determined in blood granulocytes (37 patients) and/or in May-Grünwald-Giemsa-stained myeloid colonies (11 patients for whom granulocytes were not available) using allele-specific quantitative polymerase chain

reactions (PCRs) adapted to complementary (granulocytes) or genomic (colonies) DNA.^{5,6} Formation of EECs/EMCs by bone marrow (BM) progenitors in collagen gels, serum erythropoietin, and granulocyte PRV-1 levels were also analyzed.^{3-5,7}

JAK2-V617F was detected in granulocytes from 12 of 37 SVT patients and in myeloid colonies from 2 of 8 additional patients; EMCs were observed for 14 patients (2 also formed EECs; Figure 1). Altogether, 14 (31%) of 45 SVT patients carried the JAK2-V617F mutation and 17 (38%) of 45 were positive for JAK2-V617F and/or EMCs/EECs, and were therefore considered to be suffering latent MPD. Two patients without EMCs were positive for JAK2-V617F, and 3 patients negative for JAK2-V617F had EMCs. BM histology, which was not always performed during anticoagulant treatment, was available for 22 patients and in favor of MPDs⁸ (2 PV, 9 ET) for 11 of 12 patients with latent MPDs (JAK2-V617F and/or EMCs/EECs); 1 of 2 patients with only EMCs rapidly developed typical ET. Histologic features of MPD

Table 1. Comparison of SVT patients with and without latent MPD and the JAK2-V617F mutation

	All patients		Patients with latent MPD	
	No evidence of MPD	Latent MPD	JAK2-V617F negative	JAK2-V617F positive
No. patients	28	17	3	14
Site of thrombosis, hepatic veins/portal venous system	4/24	2/15	0/3	2/12
Sex, male/female	15/13	9/8	3/0	6/8
Age, y	51 ± 16	40 ± 11	40 ± 18	42 ± 11
JAK2-V617F, copies/100 ABL	0	86 ± 91	0	110 ± 89
JAK2-WT, copies/100 ABL	774 ± 889	491 ± 476	222 ± 155	564 ± 511
Hematocrit	0.380 ± 0.57	0.396 ± 0.53	0.383 ± 0.42	0.399 ± 0.55
Hemoglobin level, g/L	127 ± 20	130 ± 15	131 ± 16	129 ± 16
Platelet count, × 10 ⁹ /L	239 ± 100	251 ± 123	237 ± 122	255 ± 128
Leukocyte count, × 10 ⁹ /L	8.0 ± 5.4	7.8 ± 5.0	7.2 ± 2.9	7.9 ± 5.4
PRV-1/ABL, CT ratio	0.962 ± 0.084	0.875 ± 0.120*	1.032 ± 0.024	0.843 ± 0.106†
EPO level, IU/L	24.5 ± 31.5	9.0 ± 8.9	6.7 ± 0.4	9.6 ± 9.9
EECs, patients positive, %	0	12	0	14
EMCs, patients positive, %	0	87	100	85
Histology in favor of MPD, no./no. total	0/10	11/12	2/2	9/10
Inherited thrombophilia, no./no. total	5/19	3/9‡	0/2	3/9
Protein C deficiency	2	0	0	0
Protein S deficiency	1	3	0	3
Heterozygous factor V Leiden mutation	1	1	0	1
Heterozygous factor II G20210A	1	0	0	0
Acquired thrombophilia	8	0	0	0
Lupus anticoagulant	2	0	0	0
Pregnancy	1	0	0	0
Hepatocarcinoma	1	0	0	0
Cirrhosis	2	0	0	0
Severe acute pancreatitis	1	0	0	0
Abdominal sepsis	1	0	0	0

Patients with no evidence of MPD are patients who did not carry the JAK2-V617F mutation and did not form EMC/EEC in vitro. Patients with latent MPD are patients who carried the JAK2-V617F mutation and/or formed EMCs/EECs in vitro. Unless stated otherwise, results were expressed as means ± SD.

CT indicates cycle threshold.

**P* = .028 compared with patients with no evidence of MPD.

†*P* = .009 compared with patients negative for JAK2-V617F, Mann-Whitney rank sum test.

‡One patient had 2 causes of inherited thrombophilia.

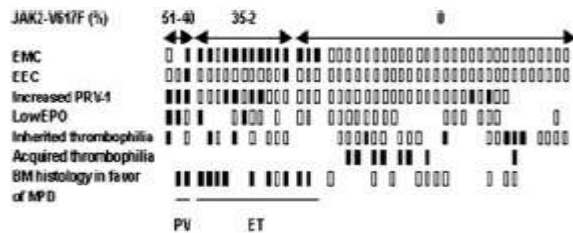


Figure 1. Patient characteristics. Results of the EMC, EEC, PRV-1, and erythropoietin (EPO) assays and bone marrow histology are shown according to the percentage of total JAK2 represented by JAK2-V617F; inherited and acquired thrombophilia are also shown. ■ indicates positive EMC and EEC assays, increased PRV-1 expression (defined as a PRV-1 cycle threshold [CT]/ABL CT ratio < 0.850), low serum EPO level (< 3.3 IU/L), presence of inherited or acquired thrombophilia, and bone marrow histology in favor of PV (panmyelosis; increased cellularity predominating on the erythroid lineage; megakaryocytes in clusters, pleiomorphic, with deeply lobulated nuclei) or in favor of ET (increased cellularity predominating on the megakaryocytic lineage; megakaryocytes in loose clusters or dispersed, large to giant, with abundant, mature cytoplasm and hyperlobulated nuclei, lacking dysplastic features; absence of fibrosis). □ indicates negative EMC and EEC assays, normal PRV-1 expression, normal or high serum EPO level, absence of inherited or acquired thrombophilia, and normal bone marrow histology results. Empty spaces mean that the assay was not performed or that the results were not available.

were not observed in 10 of 10 SVT patients negative for both EMCs/EECs and the JAK2 mutation (Figure 1). In addition, a low serum erythropoietin level (< 3.3 IU/L) was found only in MPD patients,⁷ and 7 of 9 patients with high PRV-1 levels carried the JAK2-V617F mutation, an expected finding since PRV-1 expression correlates with JAK2 activation.⁹ Consistent with our previous observation of JAK2 overexpression in reactive states,⁵ the quantification of total JAK2 transcripts revealed that granulocytes of SVT patients expressed high levels of JAK2 whether they suffer from MPDs or not (Table 1). Importantly, the proportion of mutated JAK2 was typically low (median, 18%; range, 2%-51%), close to the values found in ET.⁵ Among the 3 patients with more than 40% JAK2-V617F, 1 had EECs and the other 2 had low erythropoietin levels; 2 later developed PV. Finally, acquired thrombophilia was found in 8 of 28 patients without MPDs but never in MPD patients; association with inherited thrombophilia was equally frequent in both groups of patients (Table 1; Figure 1).

In conclusion, detection of JAK2-V617F and EECs/EMCs, which can be performed during anticoagulant treatment, diagnosed

a latent MPD, most often ET, in 38% of patients with SVT and normal/low blood cell counts. We propose that at least the presence of JAK2-V617F in blood granulocytes should be systematically investigated in such situations.

Marjorie Boissinot, Eric Lippert, Francois Girodon, Irene Dobo, Marc Fouassier, Claude Masliah, Vincent Praloran, and Sylvie Hermouet

Correspondence: Sylvie Hermouet, Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, CHU de Nantes, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes cedex, France; e-mail: sylvie.hermouet@chu-nantes.fr.

M.B. and E.L. contributed equally to this study.

Supported by grants from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) of the Région Bourgogne and the Délégation Régionale à la Recherche Clinique (DRRC) of the Région Pays de Loire and the CHU de Nantes.

References

- Chait Y, Condat B, Cazals-Hatem D, et al. Relevance of the criteria commonly used to diagnose myeloproliferative disorder in patients with splanchic vein thrombosis. *Br J Haematol*. 2005;129:553-560.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144-1148.
- Dobo I, Donnard M, Girodon F, et al. Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assay performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythaemia vera. *Hematol J*. 2004;5:161-167.
- Dobo I, Boiret N, Lippert E, et al. A standardized endogenous megakaryocytic/erythroid (EMC/EEC) colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2004;89:1203-1208.
- Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108:1865-1867.
- Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood*. 2006;108:1781-1782.
- Mossuz P, Girodon F, Donnard M, et al. Diagnostic value of serum erythropoietin level in patients with absolute erythrocytosis. *Haematologica*. 2004;89:1194-1198.
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100:2292-2302.
- Kralovics R, Teo SS, Buser AS, et al. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of JAK2. *Blood*. 2005;106:3374-3376.

b) Conclusion et commentaires

Les résultats obtenus, concernant la détection de la mutation JAK2V617F et les tests de formation de colonies endogènes, sont en faveur de la recherche systématique de la mutation JAK2V617F dans le cadre du diagnostic d'un SMP latent (le plus souvent TE) dans les cas de thromboses digestives profondes.

En conclusion des études (ARS-T et thromboses digestives), nous pouvons dire que la détection de la mutation JAK2V617F par AS-qPCR et le test de formation de colonies endogènes permettent le diagnostic de formes de SMP atypiques, le plus souvent des TE, dans les cas d'anémies réfractaires sidéroblastiques à fort taux de plaquettes et de thromboses hépatiques profondes présentant une numération globulaire normale ou basse. Dans le cas de TPS, il est important de noter que ces tests peuvent être réalisés pendant un traitement anticoagulant. Ces deux techniques représentent donc des outils fiables dans le diagnostic des formes atypiques ou latentes de SMP . Nous proposons donc qu'au moins la détection de la mutation dans les PNN du sang des patients soit réalisée systématiquement dans de telles situations.

Etude de la mutation JAK2V617F lors de transformation des SMP en leucémie aigue myéloïde

4. Theocharides A, Boissinot M et coll. Leukemic blasts in transformed JAK2V617F positive myeloproliferative disorders are frequently negative for JAK2-V617F. Blood 2007 ; 110 : 375.

i. Introduction

Dans cette étude, réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Radek Skoda à Bâle, nous avons souhaité évaluer le rôle de la mutation JAK2V617F dans la transformation des SMP en leucémies aigues myéloïdes (LAM). La transformation en LAM est l'une des complications connues des SMP. La fréquence d'apparition de la mutation JAK2V617F dans les cas *de novo* de LAM est très rare (1%). La question principale était de savoir si la présence de la mutation JAK2V617F, fortement présente dans les SMP Phi-, favorise ou non la transformation en LAM. Dans la mesure où la transformation en LAM intervient dans moins de 10% des cas de SMP, le nombre de patients disponibles pour ce type d'étude est faible, c'est pourquoi les données disponibles jusqu'alors ne permettaient pas de conclure quant à l'implication de JAK2V617F dans la transformation.

Au début de l'étude, nous avions une cohorte de 53 patients, atteints de SMP, ayant subi une transformation en LAM. Le statut JAK2 au diagnostic du SMP a pu être déterminé pour 22 patients sur 53, ce sont ces 22 patients qui sont détaillés dans l'article. Cependant, les échantillons au stade de la transformation en LAM étaient par contre disponibles pour tous les patients (n= 53). Concernant les 31 patients restants, dont le statut JAK2 n'a pas pu être déterminé en phase chronique du SMP, on remarquera, qu'au stade de la transformation en LAM, 9 sont négatifs pour la mutation JAK2V617F. Par contre, les 22 patients restants se sont révélés positifs dans les échantillons de cellules médullaires non purifiées au moment du diagnostic de LAM, on peut donc en déduire que ces patients présentaient déjà un SMP positif pour JAK2V617F. Quand la purification des blastes a pu être réalisée, il a été constaté que les blastes étaient en fait négatifs pour l'un des patients. Nous avons donc ici un patient supplémentaire présentant un SMP positif pour JAK2V617F et qui s'est transformé en LAM négative pour cette mutation. De plus, 5 patients se sont transformés en LAM positives pour

JAK2V617F. Enfin, il a été possible d'analyser 11 des 16 patients pour lesquels les blastes n'ont pas pu être purifiés. Ainsi il a été observé que 8/11 patients se sont, a priori, transformés en LAM négative pour JAK2V617F : en effet, ils présentent un taux de mutant ($< 30\%$) nettement inférieur à la quantité de blastes (70% à 100%). Enfin, les trois derniers patients se sont, a priori, transformés en LAM positive pour la mutation JAK2V617F, en effet, ces patients présentaient un taux de mutant $\geq 90\%$ avec un pourcentage de blastes aux environs de 15%. Au final, au sein de ce groupe supplémentaire de 22 patients, on dénombre 9 patients qui, d'un SMP positif pour JAK2V617F, se sont certainement transformés en LAM négative pour JAK2V617F.

La détection de la mutation a été réalisée par deux méthodes. La première méthode, utilisée par nos collaborateurs à Bâle, consiste en une PCR spécifique d'allèle (AS-PCR), basée sur les amorces antisens. Ces amorces sont fluorescentes et de tailles différentes. Les produits de PCR obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire. La deuxième méthode est celle mise au point dans notre équipe. Cette technique est spécifique d'allèle et est également quantitative (AS-qPCR), elle a été décrite dans l'article 1 (Lippert, Boissinot et al. 2006). Les échantillons utilisés sont les suivants : ADN issus de myélogrammes ou de granulocytes et de lymphocytes T préalablement triés par FACS. Les blastes leucémiques ont également été isolés, soit par FACS, soit par microdissection laser à partir de myélogrammes avant d'en extraire l'ADN. D'autres analyses ont été réalisées, par l'équipe du Dr Skoda, concernant la recherche de perte d'hétérozygotie du chromosome 9p (9pLOH), des études de clonalité par inactivation du chromosome X (uniquement chez les femmes) : étude du polymorphisme au niveau d'un nucléotide du gène MPP1 (porté par l'X).

Brief report

Leukemic blasts in transformed *JAK2-V617F*-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the *JAK2-V617F* mutation

Alexandre Theodorides,^{1,2} Marjorie Boissinot,³ François Girodon,⁴ Richard Garand,⁵ Soon-Siong Teo,¹ Eric Lippert,⁶ Pascaline Talmant,⁵ Andre Tichelli,⁷ Sylvie Hermouet,^{3,5} and Radek C. Skoda¹

¹Department of Research, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Switzerland; ²Division of Clinical Hematology, University Hospital Basel, Switzerland; ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 601, Institut de Biologie, Nantes, France; ⁴Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Dijon, France; ⁵Laboratoire d'Hématologie, CHU de Nantes, France; ⁶Laboratoire d'Hématologie, CHU de Bordeaux, France; ⁷Division of Diagnostic Hematology, University Hospital Basel, Switzerland

To study the role of the *JAK2-V617F* mutation in leukemic transformation, we examined 27 patients with myeloproliferative disorders (MPDs) who transformed to acute myeloid leukemia (AML). At MPD diagnosis, *JAK2-V617F* was detectable in 17 of 27 patients. Surprisingly, only 5 of 17 patients developed *JAK2-V617F*-positive AML, whereas 9 of 17 patients transformed to *JAK2-V617F*-negative AML. Microsatellite

analysis in a female patient showed that mitotic recombination was not responsible for the transition from *JAK2-V617F*-positive MPD to *JAK2-V617F*-negative AML, and clonality determined by the *MPP1* polymorphism demonstrated that the granulocytes and leukemic blasts inactivated the same parental X chromosome. In a second patient positive for *JAK2-V617F* at transformation, but with *JAK2-V617F*-negative leukemic

blasts, we found del(11q) in all cells examined, suggesting a common clonal origin of MPD and AML. We conclude that *JAK2-V617F*-positive MPD frequently yields *JAK2-V617F*-negative AML, and transformation of a common *JAK2-V617F*-negative ancestor represents a possible mechanism. (Blood. 2007;110:375-379)

© 2007 by The American Society of Hematology

Introduction

Myeloproliferative disorders (MPDs) are a heterogeneous group of diseases characterized by increased hematopoiesis leading to elevated numbers of nonlymphoid cells and/or platelets in the peripheral blood. An acquired somatic mutation in the *JAK2* gene resulting in a valine-to-phenylalanine substitution at position 617 (*JAK2-V617F*) is frequently found in patients with MPDs.^{1,4} Using a sensitive allele-specific polymerase chain reaction (AS-PCR) assay, the *JAK2-V617F* mutation is detectable in more than 90% of patients with polycythemia vera (PV), more than 50% of essential thrombocythemia (ET), and more than 50% of idiopathic myelofibrosis (IMF).^{2,5,6} Transformation to acute myeloid leukemia (AML) is a known complication of MPDs.⁷⁻⁹ The frequency of *JAK2-V617F* in patients with de novo AML was around 1%.¹⁰⁻¹⁵ In contrast, the *JAK2-V617F* mutation in AML secondary to MPD was in the range of 50%.^{12,14,16} The question of whether the presence of the *JAK2-V617F* mutation favors leukemic transformation is currently unanswered. Because of the small number of patients with secondary AML, prospective studies are difficult to perform and the data are at present inconclusive.¹⁷ Here, we compared the *JAK2-V617F* status before and at leukemic transformation in 27 MPD patients and performed molecular studies on purified cell populations.

Materials and methods

Patients and samples

We performed a retrospective study on 27 patients with AML secondary to MPD (8 PV, 12 ET, 7 IMF) from whom samples at MPD and AML

diagnosis were available. Informed consent from all patients alive was obtained in accordance with the Declaration of Helsinki. The study was conducted according to the guidelines of the local ethics committees at centers in France (Nantes, Dijon, Bordeaux) and Switzerland (Basel). The diagnosis of MPD was made according to the criteria of the World Health Organization (patients from Basel) or of the Polycythemia Vera Study Group (Nantes, Dijon, Bordeaux).¹⁸⁻²⁰

Cell separations, RNA and DNA isolation

Bone marrow or peripheral blood smears were scraped and DNA was isolated using the QIAamp DNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Leukemic blasts were isolated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) using side scatter and anti-CD34 antibodies or by laser capture microdissection of bone marrow films stained with May-Grünwald/Giemsa. Cells of the granulocytic lineage and T-cells were sorted by FACS using anti-CD15 and anti-CD3 antibodies, respectively. Purity was greater than 95%. Preparations of DNA and RNA and cDNA syntheses were performed as described.^{6,21,22}

Molecular analyses

The methods for detecting loss of heterozygosity on chromosome 9p (9pLOH) and for determining the copy number of chromosome 9p were described earlier.⁴ A quantitative PCR assay for *JAK2-V617F* was performed with 2 different methods,^{6,22} and analysis of clonality by X chromosome inactivation in female patients heterozygous for a single nucleotide polymorphism in the *MPP1* gene was assessed as described.²²

Submitted December 8, 2006; accepted February 24, 2007. Prepublished online as Blood First Edition paper, March 15, 2007; DOI 10.1182/blood-2006-12-062125.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2007 by The American Society of Hematology

Table 1. Summary of patient characteristics and molecular analyses in AML secondary to MPD

UPN	Sex	Dx	Age, y	Nantes, %T	MPD		Source	Cytoreductive treatment
					Basel, %T			
V617F-positive MPD/ V617F-negative AML								
NA-02	F	PV	70	79*	94†		GRA/BM-CD15+	Pipo
NA-32	F	PV	70	42	52		PB GRA	Pipo
p128	M	PV	75	nd	30		PB GRA	HU
NA-01	M	PV	64	7	12		BM smear	Pipo
DI-03	M	ET	89	38	24		PB GRA	HU
BO-04	F	ET	52	21	nd		PB GRA	None
DI-05	M	ET	69	12	nd		BM smear	HU
DI-35	F	ET	68	30	53		BM smear	HU
NA-48	M	IMF	57	31	56		BM smear	HU/Thal
V617F-positive MPD/ V617F-positive AML								
NA-59	M	PV	64	46	nd		PB GRA	HU/Pipo
p185	M	PV	65	nd	30		BM smear	HU
NA-57	F	ET	47	82	89		PB GRA‡	HU
DI-58	F	ET	64	26	34		BM smear	na
DI-60	M	IMF	71	75	nd		BM smear	None
V617F-positive MPD/V617F-uninformative AML								
NA-30	M	PV	61	44	nd		BM smear	³² P/Pipo
DI-33	F	ET	63	16	nd		BM smear	HU/Pipo
NA-52	M	IMF	64	44	40		BM smear	HU
V617F-negative MPD/V617F-negative AML								
NA-07	M	PV	53	0	nd		BM smear	Pipo
NA-10	M	ET	67	0	0		BM smear	HU
NA-11	F	ET	57	0	0		BM smear	HU/ ³² P/IFN/Ana
DI-12	M	ET	47	0	nd		BM smear	HU
DI-13	F	ET	81	0	0		BM smear	HU
DI-14	F	ET	75	0	0		BM smear	HU
NA-08	F	IMF	62	0	0		BM smear	HU/VP-16
NA-09	F	IMF	62	0	0		BM smear	Pipo/IFN
DI-20	M	IMF	65	0	nd		BM smear	na
p202	M	IMF	75	nd	0		BM smear	HU

UPN indicates unique patient number; M, male; F, female; Dx, diagnosis; nd, not done; na, not available; %T, percentage of chromosomes 9 carrying *JAK2-V617F* determined by AS-PCR; Nantes, AS-PCR was done in Nantes; Basel, AS-PCR was done in Basel; PB, peripheral blood; BM, bone marrow; GRA, granulocytes; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; BMMC, bone marrow mononuclear cells; Pipo, pipobroman; HU, hydroxyurea; Thal, thalidomide; ³²P, phosphorus 32; VP-16, etoposide; IFN, interferon- α ; Ana, anagrelide; none, no cytoreductive treatment; FAB, AML diagnosis according to FAB classification; bi, biphenotypic leukemia; delay, interval between MPD and AML diagnosis in years; %Blasts, percentage of leukemic blasts on smear; LC-blasts, leukemic blasts isolated by laser capture microdissection.

*%T determined in PB GRA.

†%T determined in BM CD15+ cells.

‡Sample was taken 9 months before transformation to AML (not at MPD diagnosis), but no signs of AML were present in PB at this time.

Statistical analysis

To compare continuous variables among the groups we used the Mann-Whitney *U* test.

Results and discussion

We determined the *JAK2-V617F* mutation status by AS-PCR in 27 MPD patients (8 PV, 12 ET, and 7 IMF) from whom we obtained paired DNA samples at MPD diagnosis and leukemic transformation. At MPD diagnosis, the *JAK2-V617F* mutation was present in 17 of 27 patients (63%) (Table 1). Surprisingly, in 7 of these 17 patients, the *JAK2* mutation was undetectable in unfractionated peripheral blood or bone marrow samples at transformation to AML. Our AS-PCR assays have a detection limit of less than 1%T.^{6,22} In 2 additional patients, we found that leukemic blast cells purified by FACS (patient DI-35) or laser capture microdissection (patient NA-48) were negative for *JAK2-V617F*, although the *JAK2* mutation was detectable in unfractionated AML samples (Table 1).

Thus, 9 of 17 patients (53%) with *JAK2-V617F*-positive MPD displayed *JAK2-V617F*-negative leukemic blasts at diagnosis of AML. Purified granulocytes or CD15-positive myeloid cells obtained in 6 of these 9 patients were also negative for the *JAK2* mutation, suggesting that the AML clone exerted a suppressive effect on the *JAK2-V617F*-positive MPD clone (Table 1). In 5 patients (29%), we found *JAK2-V617F* both at MPD diagnosis and in leukemic blasts at transformation. In these 5 patients, the allelic ratio of *JAK2-V617F* in blasts was more than 50%T, suggesting that at least a proportion of blasts were homozygous for *JAK2-V617F*. In the remaining 3 of 17 patients (18%) with *JAK2-V617F*-positive MPD, the mutational status of the AML blasts could not be determined with certainty because of a lack of purified cells.

Patients positive for *JAK2-V617F* at MPD diagnosis who transformed to *JAK2-V617F*-negative AML had a markedly shorter interval between diagnosis of MPD and leukemic transformation than those who transformed to *JAK2-V617F*-positive AML (3 ± 2 versus 10 ± 7 years; $n = 14$; $P = .013$) (Table S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental

Table 1. Summary of patient characteristics and molecular analyses in AML secondary to MPD (continued)

AML																		
Patient characteristics				Unfractionated cell samples				Purified cells										
UPN	FAB	Age, y	Delay, y	Molecular and/or P cytogenetic abnormalities	%Blasts	Nantes, %T		BaseI, %T	Granulocytic lineage			Purified leukemic blasts			T-cells			
						Source	%T		%T	Source	%T	Source	Method	%T	Source	Method	%T	Source
V617F-positive MPD/V617F-negative AML																		
NA-02	M2	72	2	normal	10	BM smear	0	0	BMMC	0	PB-GRA	Ficoll	0	PB-CD34+	FACS	0	PB-CD3+	FACS
NA-32	M1	72	2	nd	70	BM smear	0	0	BM smear		na	na	na	na	na	na	na	na
p128	M4	80	5	Flt-3-ITD	58	PB smear	nd	0	PBMC	0	PB-CD15+	MACS	0	PB-CD34+	MACS	na	na	na
NA-01	M0	72	8	nd	91	BM smear	0	0	BM smear		na	na	na	na	na	na	na	na
DI-03	na	91	2	-Y	42	PB smear	0	0	PBMC	0	PB-GRA	Ficoll	0	PB-CD34+	FACS	0	PB-CD3+	FACS
BO-04	M1	54	2	t(10;16)	93	PB smear	0	0	PBMC	0	PB-GRA	Ficoll	na	na	na	na	na	na
DI-05	M6	71	2	complex, del(5q), +7, -Y	52	BM smear	0	0	BMMC	0	BM-CD15+	FACS	0	BM-CD34+	FACS	na	na	na
DI-35	M4	72	4	complex, del(5q)	45	BM smear	4	2	BMMC	0	BM-CD15+	FACS	0	PB/BM-CD34+	FACS	0	PB/BM-CD3+	FACS
NA-48	M2	59	2	complex, del(11q23)	35	BM smear	nd	51	BM smear		na	na	na	0	LC-blasts	LC	na	na
V617F-positive MPD/V617F-positive AML																		
NA-59	na	67	3	nd	15	PB smear	75	nd	PBMC	90	PB-GRA	Ficoll	85	PB-CD34+	FACS	10	PB-CD3+	FACS
p185	M2	83	18	+8	75	BM smear	nd	69	PB-CD34+	65	PB-CD15+	FACS	69	PB-CD34+	FACS	na	na	na
NA-57	na	60	13	complex, del(20q), del(5q)	15	BM smear	71	80	PBMC	78	PB-GRA	Ficoll	100	PB-CD34+	FACS	0	PB-CD3+	FACS
DI-58	M2	78	14	complex, del(20q), -5, -7, +8	30	BM smear	41	66	BMMC	46	PB-GRA	Ficoll	56	PB-CD34+	FACS	1	PB-CD3+	FACS
DI-60	na	74	3	nd	73	PB smear	80	nd	PBMC	na	na	na	na	na	na	na	na	na
V617F-positive MPD/V617F-uninformative AML																		
NA-30	M2	68	7	nd	18	BM smear	43	67	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
DI-33	M1	74	11	nd	91	BM smear	15	nd	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
NA-52	M7	69	5	nd	24	BM smear	nd	59	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
V617F-negative MPD/V617F-negative AML																		
NA-07	M6	64	11	nd	75	BM smear	0	0	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
NA-10	M4	74	7	nd	65	PB smear	nd	0	PB smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
NA-11	M2	73	16	nd	46	PB smear	nd	0	PB smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
DI-12	M7	49	2	complex	34	BM smear	0	nd	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
DI-13	M7	83	2	complex, del(5q), -7	36	BM smear	0	0	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
DI-14	M2	77	2	nd	43	BM smear	0	0	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
NA-08	na	69	7	nd	48	PB smear	nd	0	PB smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
NA-09	bi	73	11	nd	38	BM smear	0	0	BM smear	na	na	na	na	na	na	na	na	na
DI-20	M7	67	2	nd	14	BM smear	0	0	BMMC	na	na	na	na	na	na	na	na	na
p202	na	80	5	nd	95	PB smear	nd	0	PBMC	na	na	na	na	na	na	na	na	na

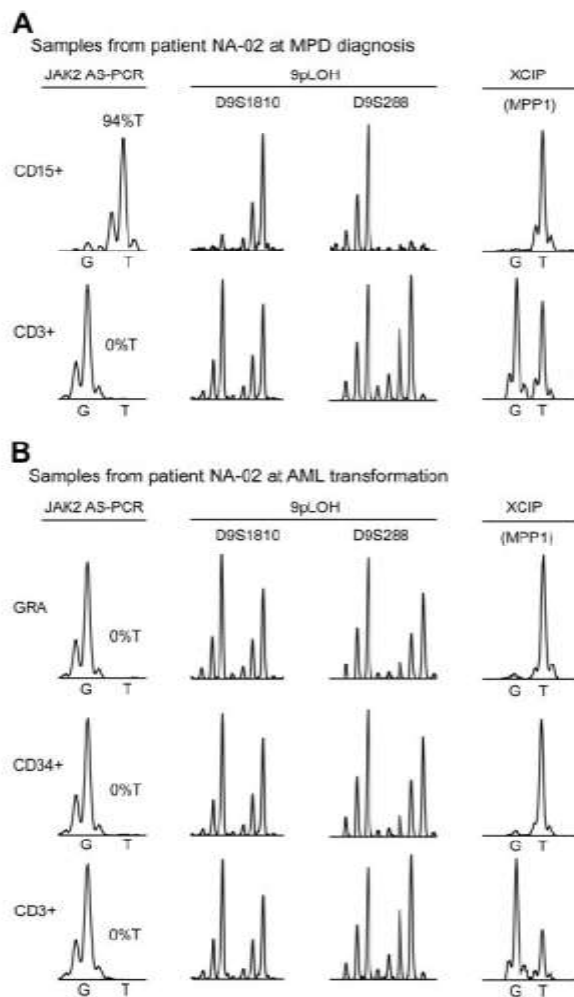


Figure 1. Analysis of clonal markers in patient NA-02. (A) Bone marrow samples at MPD diagnosis. The presence of the *JAK2-V617F* mutation was determined by AS-PCR using DNA from purified cells: CD15⁺, myeloid cells isolated by FACS; CD3⁺, T cells isolated by FACS. %T indicates the allelic ratio between the mutant and wild-type *JAK2* allele. 9pLOH was determined with the microsatellite markers *D9S1810* and *D9S288* using DNA from purified cells as for *JAK2*. XCIP was determined by AS-PCR for a G/T polymorphism in the *MPP1* mRNA. The relative expression of the 2 *MPP1* alleles was determined by comparing the G and T peak intensities obtained by the allele-specific reverse transcription-PCR assay. (B) Peripheral blood samples at AML transformation. GRA, Granulocytes isolated by Ficoll density centrifugation; CD34⁺, leukemic blasts isolated by FACS; CD3⁺, T cells isolated by FACS. The assays were performed as in (A).

Materials link at the top of the online article). Information on treatment during the MPD phase was available in 25 of 27 patients (93%). Two patients transformed to AML without cytoreductive treatment, whereas the remaining patients received hydroxyurea (15 patients), pipobroman (6 patients), or other cytoreductive drugs (Table 1).

To address the question whether the MPD and AML clones in these patients arose de novo from different progenitor or stem cells, or represent subclones derived from a common ancestor, we performed molecular analyses in 2 cases. In one female patient with PV (NA-02), we compared clonality by 9pLOH and X chromosomal inactivation pattern (XCIP) in purified cell populations at both stages of the disease (Figure 1). At diagnosis of MPD, this patient had 94%T and displayed 9pLOH (Figure 1A). Deletion of chromosome 9p was excluded by determining the copy number using quantitative PCR (Figure S1). A phase resembling neutrophilic leukemia was observed in this patient 3 months before transformation to AML (white blood cells [WBCs], $159 \times 10^9/L$,

with 75% neutrophils, 6% metamyelocytes, and 14% myelocytes, but no blasts). At this stage, the neutrophils were already negative for *JAK2-V617F* (not shown). At transformation to AML, the purified granulocytes and leukemic blast cells isolated by FACS were negative for *JAK2-V617F* and displayed no 9pLOH (Figure 1B). Thus, the AML clone did not arise from a MPD progenitor heterozygous for *JAK2-V617F* that lost the mutated *JAK2* allele during mitotic recombination. A similar conclusion was reached in another MPD patient who transformed to AML.²³ Using the *MPP1* expression assay to determine clonality by XCIP,^{24,25} we found that the granulocytes at MPD diagnosis were clonal (Figure 1A). At diagnosis of AML, peripheral blood granulocytes and leukemic blast cells purified from peripheral blood by FACS were clonal and expressed *MPP1* from the same parental X chromosome as the granulocytes at MPD diagnosis (Figure 1B). This result is compatible with a common origin of the MPD and AML clone, but does not rule out that 2 clones arose independently, because the AML blasts could fortuitously have inactivated the same X chromosome as the MPD clone. In a second patient (NA-48) with initially *JAK2-V617F*-positive MPD, we found at the time of leukemic transformation *JAK2-V617F* to be absent in isolated blast cells, but present in unfractionated bone marrow cells with an allelic ratio of 51%T (Table 1; Figure S2). Del(11q) was found in 20 of 20 metaphases by cytogenetic analysis and in 99 of 100 cells by interphase fluorescence in situ hybridization (FISH). These data suggest that the *JAK2-V617F*-negative blasts and the *JAK2-V617F*-positive bone marrow cells carry the same deletion, implying that they share a common clonal origin. Interestingly, the same region on chromosome 11 was previously identified in a genome-wide screening for LOH.²⁶

In summary, the unexpected finding of *JAK2-V617F*-negative leukemia in patients with previously *JAK2-V617F*-positive MPD could be explained by 2 models: first, MPD and AML represent 2 independent clones that arose de novo from different progenitor or stem cells, or second, MPD and AML are 2 subclones derived from a common ancestor. Our data on patient NA-02 are compatible with both models, whereas the results from patient NA-48 favor a common clonal origin of MPD and AML and suggest that an additional clonal event may precede the acquisition of *JAK2-V617F* in the pathogenesis of MPD.

Acknowledgments

We thank Verena Jäggin (Basel, Switzerland) for FACS sorting; Danielle Pineau (Nantes, France) for excellent technical assistance; Francine Mugneret (Dijon, France) for cytogenetic and FISH analyses; Céline Schaeffer (Dijon) for collecting patients' data; Jean-Luc Harousseau (Nantes) for allowing access to the patients' archived files; Denis Caillot (Dijon) and Bruno Salles (Châlons-sur-Saône, France) for providing samples and patient data; and Alois Gratwohl (Basel), Jürg Schwaller (Basel), Ralph Tiedt (Basel), and Robert Kralovics (Vienna, Austria) for comments on the manuscript. A. Theodorides was a fellow of the Postgraduate Course in Experimental Biology and Medicine funded by the Freiwillige Akademische Gesellschaft Basel and the Novartis Foundation.

This work was supported by grants 310000-108006/1 from the Swiss National Science Foundation and the Swiss Cancer League (OCS-01742-08-2005) (R.C.S.) and from the Program Hospitalier de Recherche Clinique of the Région Bourgogne (F.G.), and from the Grand Ouest (S.H.) and Aquitaine-Charente (E.L.) Committees of the Ligue Nationale contre le Cancer.

Authorship

Contribution: A. Theocharides performed research, analyzed data, and wrote the paper; M.B. performed research and analyzed data; F.G., R.G., and E.L. provided essential reagents and analyzed data; S.-S.T. performed research; P.T. performed cytogenetics and FISH studies; A. Tichelli

analyzed data; S.H. designed and performed research and analyzed data; and R.C.S. designed research, analyzed data, and wrote the paper.

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

Correspondence: Radek C. Skoda, Department of Research, Experimental Hematology, University Hospital Basel, Hebelstrasse 20, 4031 Basel, Switzerland; e-mail: radek.skoda@unibas.ch.

References

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005; 434:1144-1148.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365: 1054-1061.
3. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7:387-397.
4. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790.
5. Antonioli E, Guglielmelli P, Pancrazzi A, et al. Clinical implications of the JAK2 V617F mutation in essential thrombocythemia. *Leukemia*. 2005; 19:1847-1849.
6. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, et al. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2006;108: 1865-1867.
7. Jaffe ES, Harris NL, Stein H. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
8. Sterkers Y, Preudhomme C, Lai JL, et al. Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes following essential thrombocythemia treated with hydroxyurea: high proportion of cases with 17p deletion. *Blood*. 1998;91:616-622.
9. Shibata K, Shimamoto Y, Suga K, Sano M, Matsuzaki M, Yamaguchi M. Essential thrombocythemia terminating in acute leukemia with minimal myeloid differentiation—a brief review of recent literature. *Acta Haematol*. 1994;91:84-88.
10. Levine RL, Loriaux M, Huntly BJ, et al. The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2005;106: 3377-3379.
11. Steensma DP, Dewald GW, Lasho TL, et al. The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2005;106:1207-1209.
12. Jelinek J, Oki Y, Gharibyan V, et al. JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia. *Blood*. 2005;106:3370-3373.
13. Scott LM, Campbell PJ, Baxter EJ, et al. The V617F JAK2 mutation is uncommon in cancers and in myeloid malignancies other than the classic myeloproliferative disorders. *Blood*. 2005;106: 2920-2921.
14. Frohling S, Lipka DB, Kayser S, et al. Rare occurrence of the JAK2 V617F mutation in AML subtypes M5, M6, and M7. *Blood*. 2006;107:1242-1243.
15. Lee JW, Kim YG, Soung YH, et al. The JAK2 V617F mutation in de novo acute myelogenous leukemias. *Oncogene*. 2006;25:1434-1436.
16. Rossi D, Deambroggi C, Capello D, et al. JAK2 V617F mutation in leukaemic transformation of Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2006;135:267-268.
17. Wolanskyj AP, Lasho TL, Schwager SM, et al. JAK2 mutation in essential thrombocythemia: clinical associations and long-term prognostic relevance. *Br J Haematol*. 2005;131:208-213.
18. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100: 2292-2302.
19. Murphy S. Diagnostic criteria and prognosis in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Semin Hematol*. 1999;36:9-13.
20. Pearson TC. Evaluation of diagnostic criteria in polycythemia vera. *Semin Hematol*. 2001;38:21-24.
21. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood*. 2006;108:1781-1782.
22. Kralovics R, Teo SS, Li S, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. *Blood*. 2006;108:1377-1380.
23. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. *Blood*. 2006; 108:3548-3555.
24. Luhovy M, Liu Y, Belickova M, Prchal JF, Prchal JT. A novel clonality assay based on transcriptional polymorphism of X chromosome gene p55. *Biol Blood Marrow Transplant*. 1995;1:81-87.
25. Liu E, Jelinek J, Pastore YD, Guan Y, Prchal JF, Prchal JT. Discrimination of polycythemia and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood*. 2003;101:3294-3301.
26. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2002;30:229-236.

ii. Conclusion et commentaires

Cette étude a mis en évidence que quand les patients positifs pour JAK2V617F se transforment en LAM, les blastes sont le plus souvent négatifs pour JAK2V617F. Cette évolution peut être expliquée par deux modèles : soit le clone leucémique se développe de novo à partir d'un progéniteur n'appartenant pas au clone SMP, soit les deux clones possèdent un progéniteur commun non porteur de la mutation JAK2V617F. Ce dernier modèle implique l'intervention d'un événement antérieur à la mutation JAK2V617F responsable de la clonalité dans le développement des SMP. Ce modèle est donc en faveur du caractère secondaire de l'apparition de la mutation JAK2V617F dans les SMP.

Ces résultats suggèrent également que la mutation JAK2V617F pourrait exercer un effet protecteur vis à vis de la transformation en leucémie comme le montre l'intervalle de temps plus court de transformation pour les patients atteints de SMP négatif pour la mutation JAK2V617F, par rapport aux patients porteurs de la mutation (3 ± 2 ans vs 10 ± 7 ans ; $n=14$; $p=0,013$).

Enfin, cette étude aura été l'occasion de comparer deux techniques de détection de la mutation JAK2V617F et de constater que ces deux méthodes donnent des résultats similaires.

III. Etudes des cytokines dans la Polyglobulie de Vaquez

Formation de colonies érythroïdes endogènes par les progéniteurs médullaires en présence d'interleukine 11 et d'interleukine 8.

1. Corre-Buscail I, Pineau D, Boissinot M, Hermouet S. Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukins 11 and 8. Exp Hematol 2005 ; 33 :1299.

i. Introduction

La polyglobulie de Vaquez se caractérise par une production excessive de cellules érythroïdes matures et un taux d'Epo sérique bas. Les progéniteurs de PV sont hypersensibles aux cytokines et sont capables de générer des colonies érythroïdes endogènes (CEE) en absence d'addition de cytokines dont l'Epo. En complément de l'anomalie d'origine au niveau d'un progéniteur multipotent, la production de molécules intra- ou extra-cellulaires pourrait contribuer à rendre les progéniteurs plus sensibles à la réponse aux cytokines. De plus, il a été démontré que la formation des CEE est partiellement dépendante des cellules « accessoires » (cellules stromales médullaires, cellules endothéliales, macrophages, lymphocytes, toutes les cellules productrices de cytokines).

Lors d'une précédente étude, notre équipe a mis en évidence l'hyperproduction d'IL-11 et d'IL-8 chez les patients atteints de PV (Hermouet, Godard et al. 2002). Ces deux cytokines ont été mesurées à des taux élevés dans le sérum, le plasma médullaire et les surnageants de culture de cellules stromales de patients.

L'étude dont il est question ici avait pour but de rechercher l'implication éventuelle de l'IL-11 et de l'IL-8 dans la formation de colonies endogènes érythroïdes caractéristiques de la PV. Des tests de formation de colonies endogènes sur gel de collagène ont été réalisés à partir de progéniteurs CD34⁺ et CD36⁺ cultivés en présence ou en absence de cytokines : Epo, SCF, IL-11 et IL-8. L'effet d'anticorps neutralisant anti-IL-11 et anti-IL-8 a également été étudié sur ces cultures. Enfin, nous avons procédé à des études de signalisation sur les voies JAK/STAT et MAPK ERK1/2.

Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukin-11 and interleukin-8

Isabelle Corre-Buscail^a, Danielle Pineau^b, Marjorie Boissinot^a, and Sylvie Hermouet^{a,b}

^aINSERM, U601, Groupe "Cytokines, Récepteurs en Immunocancérologie," Nantes, France; ^bLaboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie des Hôpitaux de Nantes, Nantes, France

(Received 7 March 2005; revised 20 July 2005; accepted 22 July 2005)

Objective. Endogenous erythroid colonies (EECs), formed *in vitro* without erythropoietin (Epo) or other exogenous cytokines, are characteristic of *Polycythemia vera* (PV). Our aim was to identify specific conditions of culture of bone marrow (BM) progenitors allowing formation of erythroid colonies without Epo.

Methods. BM mononuclear cells (BMMCs), purified CD34⁺ cells, and purified CD36⁺ erythroid progenitors were cultured in serum-free media without and with cytokines: Epo, stem cell factor (SCF), and interleukin (IL)-11 and IL-8, produced by BM stromal cells and found elevated in PV.

Results. EECs were formed in PV cultures of either BMMCs or CD34⁺ cells, which include cytokine-secreting cells, but not in cultures of purified CD36⁺ erythroid progenitors (EP). Despite expression of V617F JAK-2, no constitutive activation of JAK-2, Stat-5, or Erk-1/2 was detected in erythroblasts issued from PV CD36⁺ progenitors. However, when SCF was provided, PV CD36⁺ progenitors formed erythroid colonies without Epo. The ability to form erythroid colonies with SCF alone was conferred to BM progenitors of healthy donors and secondary erythrocytosis by exposure to IL-11 and IL-8. Both IL-11 and IL-8 enhanced formation of erythroid colonies in response to Epo and interfered with the activation of Erk-1/2 and Stat-5 induced, respectively, by SCF and Epo in erythroblasts. Anti-IL-11 antibody inhibited formation of erythroid colonies by PV BMMCs and CD34⁺ cells.

Conclusion. The data indicate that PV erythroid progenitors remain cytokine-dependent and that normal BM progenitors exposed to IL-11 and IL-8 can acquire the ability to form erythroid colonies without Epo. © 2005 International Society for Experimental Hematology. Published by Elsevier Inc.

Polycythemia vera (PV) is characterized by excessive, chronic production of mature erythroid cells and low serum erythropoietin (Epo); PV progenitors are hypersensitive to cytokines and generate endogenous erythroid colonies (EECs) *in vitro* in the absence of cytokines, including Epo. PV is thought to originate from an anomaly of a multipotent progenitor expressed preferentially in the erythroid lineage but the production of either intra- or extracellular molecules rendering progenitors more responsive to cytokines could also explain EEC formation [1–3]. Recently, several groups described expression of a presumably activating mutation of JAK-2 (V617F) in the majority of PV and other myeloproliferative disorders (MPDs) [4–7]. However, EECs have been

shown to be partially dependent on "accessory cells" present among the bone marrow (BM) mononuclear cells (BMMCs) used for EEC assays: BM stromal cells (BMSCs), endothelial cells, macrophages, lymphocytes, all cytokine-secreting cells [8]. Antibodies (Abs) directed against stem cell factor (SCF), GM-CSF, interleukin (IL)-3 or IL-6 were reported to have no effect on the proliferation of PV progenitors, rendering unlikely that deregulation of these cytokines played a role in PV pathogenesis. Interestingly, high levels of IL-11 and IL-8 were found in blood, BM plasma, and supernatants of BM stroma cells of PV patients [9,10]. IL-11 stimulates erythropoiesis and thrombopoiesis; IL-8, a proinflammatory cytokine, can enhance survival and proliferation of hematopoietic progenitors [11–13]. In the present study of PV (all expressing JAK-2 V617F), the ability of PV progenitors to form EECs depended on their degree of purification and differentiation and was affected by anti-IL-11

Offprint requests to: Sylvie Hermouet, M.D., Ph.D. INSERM U601, Institut de Biologie, CHU Nantes, 9 Quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France.

and anti-IL-8 neutralizing Abs. The effects of IL-11 and IL-8 on intracellular signaling of erythroid progenitors in response to SCF and EPo were studied.

Materials and methods

Patients

With consent and before treatment, BM samples were obtained from 44 patients (23 PV, four idiopathic erythrocytosis [IE], 17 secondary erythrocytosis [SE]) with absolute erythrocytosis (packed cell volume >0.51 in men, >0.48 in women) diagnosed according to WHO criteria [1,14]. All selected PV had low serum EPo and a positive EEC assay; all IE had normal serum EPo, a negative EEC assay, and no cause of SE; all SE had high or normal serum EPo, no EECs, and a documented cause of SE. Normal BM was obtained from allograft donors.

Reagents

IL-11 was from Roche Diagnostics (Meylan, France), IL-8 (72 amino acid form) from PeproTech Inc. (Rocky Hill, NJ, USA). Neutralizing polyclonal Abs were goat anti-human IL-11 (R & D, Abingdon, UK) or rabbit anti-human IL-8 (Endogen, Cambridge, MA, USA) and mouse monoclonal anti-human anti-CXCR-1 or anti-CXCR-2 (IL-8 receptors; R & D) immunoglobulin G. IL-11 and IL-8 were used at 10 ng/mL and Abs at 10 to 30 µg/mL.

BMMC preparation

BM samples were centrifuged at 150g for 10 minutes without brake. Supernatant (= BM plasma) was pipetted off and cell pellets suspended in RPMI; BMMCs were separated on Ficoll medium (1.077 g). After washing, aliquots of BMMCs were used for immediate cultures or cell purification or frozen in dimethylsulfoxide in liquid nitrogen.

Purification of BM CD34⁺ progenitors

CD34⁺ cells were purified from BMMCs by selection with anti-CD34 Ab-coated magnetic beads (Miltenyi, France) or StemSep CD34⁺ magnetic colloid (StemCell Technologies, Grenoble, France). Previous cytometry studies had shown purity of CD34⁺ cells thus separated to be at least 95%.

Purification of BM CD36⁺ Erythroid Progenitors

BMMCs (10⁷/20 mL) were grown in serum-free StemAlpha A liquid medium (StemAlpha, France) with SCF (25 ng/mL), IL-3, and IL-6 (10 ng/mL each; R & D, Abingdon, UK) for 48 hours. Non-adherent cells were then transferred to a new flask and fresh medium and cytokines were added. At day 6, cells were washed and CD36⁺ erythroid progenitors were purified as described by Freyssonier et al. [15]. CD36 expression was used as a marker of late erythroid progenitors (colony-forming unit erythroid [CFU-E], proerythroblasts, erythroblasts). Some of the purified CD36⁺ cells were used for clonogenic assays; the rest was grown for 6 more days in liquid StemAlpha A medium with SCF, IL-3, IL-6 and EPo (2 IU/mL, gift from Roche Diagnostics, Germany). At day 12, cells (100% erythroblasts, Fig. 1A) were harvested for signal transduction studies. In burst-forming unit erythroid (BFU-E)/CFU-GM clonogenic assays with cytokines, purified CD36⁺ cells never formed granulomonocytic colonies, only CFU-E and BFU-E (Fig. 1B).

Clonogenic assays

Clonogenic assays were performed in duplicate or triplicate in serum-free, collagen-based, semisolid medium: Megacult with lipids and human collagen (StemCell Technologies, Grenoble, France) are described elsewhere [16–18]. BMMCs (10⁵/mL), CD34⁺ cells (10³ or 5 × 10³/mL) or CD36⁺ EP (5 × 10³/mL) were grown for 7 days without (EEC assay) or up to 14 days with cytokines. EPo was used at 0.05 IU/mL assuming it would discriminate PV from SE. Erythroid colonies were counted after

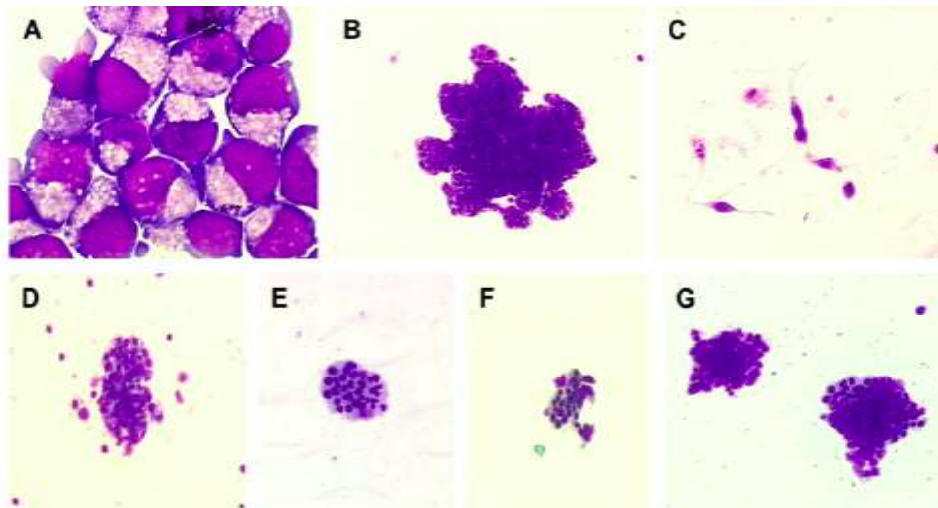


Figure 1. Erythroblasts and erythroid colonies formed by BMMCs and purified BM progenitors. (A): Erythroblasts obtained from CD36⁺ progenitors purified at day 6 and grown until day 12 with SCF, IL-3, IL-6, and EPo (×100 magnification). (B,D–G): Typical erythroid colonies in MGG-stained collagen gels (×10 magnification) formed by (B) purified CD36⁺ progenitors in the presence of SCF (10 ng/mL) and EPo (0.05 IU/mL); (D) PV BMMCs without cytokine; (E) purified PV CD34⁺ progenitors without cytokine; (F) purified PV CD36⁺ progenitors with SCF alone; (G) purified SE CD36⁺ progenitors with EPo. (C): Stromal cells in a culture of purified BM CD34⁺ cells (×10 magnification). Note: (C) and (E) show cells grown in the same gel.

May-Grünwald-Giemsa (MGG) staining of the gels and classified as CFU-E (small colonies of 8 to 100 mature erythroblasts) or BFU-E (large colonies of more than 100 erythroblasts). EEC assays were considered positive when at least one CFU-E or BFU-E was detected (Fig. 1D); EEC assays with no erythroid colony were considered negative only when the control BFU-E/CFU-GM cells assay with cytokines confirmed adequate colony growth (≥ 50 BFU-E/ 10^5 cells) [16,17]. For BFU-E/CFU-GM assays, BMMCs (2×10^4 /mL) and CD36⁺ cells (5×10^3 /mL) were plated with SCF, IL-3, IL-6, GM-CSF, G-CSF (10 ng/mL each), and EPo (1 IU/mL). For CFU-MK assays, BMMCs (10^5 /mL) were plated with thrombopoietin (50 ng/mL) and IL-3 and IL-6 (10 ng/mL each). BFU-E/CFU-GM assays were scored at day 14; CFU-MK assays were scored at day 10.

Signal transduction studies

Day 12 CD36⁺ erythroblasts were starved for 4 hours without cytokine or serum, then stimulated with cytokines (EPo: 10 IU/mL; SCF, IL-11 and IL-8: 50 ng/mL each) for 10 minutes at 37°C. Stimulation was stopped by cold phosphate-buffered saline and by placing cells on ice. Cells were pelleted and lysed for 20 minutes on ice in 1% Nonidet-P40 Lysis Buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA), 50 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL aprotinin). Detergent-insoluble material was removed by centrifugation (4°C, 30 minutes, 12,000 rpm). Protein concentration was determined using the BCA method (Pierce, New York, NY, USA). Proteins (20 µg) were boiled in Laemmli sample buffer, separated on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) then immunoblotted with indicated Ab: anti-phospho Erk1/2 (Thr 202/Tyr204) and anti-Erk1/2 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), anti-phospho Stat-5 a/b (Tyr 694; Zymed, San Francisco, CA, USA) and anti-stat-5 a/b (Transduction Laboratories, Lexington, England), or anti-phospho JAK-2 (Tyr 1007/1008; Cell Signaling Technology) and anti-JAK-2 (C-20; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Immunoreactive

bands were detected by using BM Chemiluminescence Blottins Kit (Roche, Meylan, France).

Characterization of mutant JAK-2 expression

Depending on available material, expression of JAK-2 V617F was studied by allele-specific quantitative polymerase chain reaction (PCR) performed either on neutrophil cDNA prepared previously for studies of PRV-1 expression (unpublished data) or by allele-specific PCR performed on genomic DNA extracted from erythroid colonies using the QIAamp DNA minikit for blood and tissue samples (QIAGEN, Valencia, CA, USA). In both cases, PCR amplification was performed with wild-type JAK-2-specific forward primer 5'-GCGCGGTTTAAATTATGGAGTATGTG-3' or V617F JAK-2-specific forward primer 5'-GCGCGGTTTAAATTATGGAGTATGTT-3' and reverse primer 5'-CCGCTTTTTCAGATATGTATCTAGTGATCC-3' common to both forms of JAK-2. After 5 minutes at 94°C, the amplification program consisted of 40 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C, 40 seconds at 72°C for 35 cycles followed by 5 minutes at 72°C. PCR products were run on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide for ultraviolet visualization.

Statistical analysis

Mann-Whitney's rank sum test was used to analyze cytokine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) data (mean values differed from median values), Fisher's exact test to compare ratios, Wilcoxon's signed rank test to compare data of groups of cultures, and Student's *t*-test to compare triplicates of cultures and ELISA. *P* < 0.05 was statistically significant.

Results

Formation of erythroid colonies by BMMCs

Without cytokine. (See Table 1.) Twenty-seven (two healthy donors, 17 SE, 8 PV) BMMC cultures were performed. In agreement with previous studies [16–18], endogenous

Table 1. Effects of IL-11 and IL-8 on erythroid colony formation by BMMCs

	Erythroid colonies/ 10^5 BMMCs				
	Control	IL-11	IL-8	Anti-IL-11 Ab	Anti-IL-8 Ab
Without cytokine					
PV	n = 8	n = 8	n = 8	n = 7	n = 7
Mean $\pm$ SD	27.8 $\pm$ 29.8	33.9 $\pm$ 26.1*	44.4 $\pm$ 38.1*	14.9 $\pm$ 14.2	16.3 $\pm$ 11.2
Median (range)	12.5 (3–78)	28.0 (4–84)	26.5 (3–105)	11.0 (1–45)	17.0 (3–36)
With cytokines					
SE	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8	n = 8
Mean $\pm$ SD	183 $\pm$ 129	228 $\pm$ 178	214 $\pm$ 145	155 $\pm$ 120	128 $\pm$ 114*
Median (range)	202 (25–360)	192 (40–510)	210 (50–460)	170 (25–367)	75 (30–340)
PV	n = 14	n = 12	n = 12	n = 14	n = 12
Mean $\pm$ SD	276 $\pm$ 250	343 $\pm$ 430	353 $\pm$ 358	160 $\pm$ 184*	209 $\pm$ 176*
Median (range)	202 (60–1065)	222 (58–1654)	220 (664–1330)	125 (28–745)	169 (55–655)

BMMCs (10^5 per milliliter) were plated in collagen gels without cytokine (EEC assays) or with cytokines (BFU-E/CFU-GM assays, see Methods). Cultures were performed without (control) or with 10 ng/mL of IL-11 or IL-8, or with 30 µg/mL of anti-IL-11 or anti-IL-8 Ab, as indicated. Endogenous CFU-E and stimulated erythroid colonies (CFU-E, BFU-E) were scored. For each patient, results of cultures were expressed as averages of triplicate colony numbers. Data are means and medians of groups of patients. n = number of patients tested.

**p* < 0.05 compared to control cultures, Wilcoxon's signed-rank test.

CFU-E and CFU-MK were never observed in cultures of healthy donors and SE patients and were not induced by IL-11 and IL-8, singly or together (not shown). In PV, EEC assays were positive for all patients; a typical EEC is shown in Figure 1D. IL-11 and IL-8 significantly increased CFU-E numbers, by an average of 22 and 60%, respectively. Neutralizing anti-IL-11 Ab significantly inhibited EEC formation for five of the seven PV tested: PV1 (–71%), PV2 (–85%), PV4 (–52%), PV53 (–50%), and PV81 (–37%). Anti-IL-8 Ab significantly inhibited EEC for three PV: PV2 (–69%), PV4 (–54%), and PV81 (–62%). Confirming IL-8 dependence, neutralizing Ab directed against IL-8 receptors, anti-CXCR-1 Ab and anti-CXCR-2 Ab, significantly inhibited EECs for PV2 (–67 and –55%, respectively). The combination of anti-CXCR-1 Ab and anti-CXCR-2 Ab completely inhibited EECs for PV81; irrelevant Abs had no effect (not shown).

With cytokines. (See Table 1.) The effects of IL-11 and IL-8 were studied in BFU-E/CFU-GM assays and in CFU-MK assays performed with BMMCs of 22 patients (8 SE, 14 PV). IL-11, IL-8, anti-IL-11, and anti-IL-8 Abs had no effect on CFU-GM formation (not shown). Overall, within each group of patients, IL-11 and IL-8 had no significant effect on cytokine-stimulated formation of erythroid colonies. Taking patients individually, IL-11 and IL-8 stimulated formation of erythroid colonies in a third of PV cultures: IL-11 significantly increased erythroid colonies for four PV and one SE; IL-8 significantly increased erythroid colonies for five PV and one SE. More importantly, anti-IL-11 Ab significantly inhibited formation of erythroid colonies for 13 of 14 PV, by an average of –42%. The exception was PV4, whose BMSCs had the highest production of IL-11 of the series (58.5 pg/1000 BMSCs/48 hours). Anti-IL-11 Ab had no effect on CFU-E, BFU-E and CFU-MK in SE and no effect on CFU-MK in PV (not shown). Anti-IL-8 Ab, which had no effect on CFU-MK, modestly but significantly decreased erythroid colonies in SE and in PV (averages: –30 and –25%, respectively). Erythroid colony formation was also inhibited by anti-CXCR-1 Ab in three PV cultures tested (–23, –24, –47%) and by anti-CXCR-2 Ab in two of them (–19, –41%). As specificity controls, CFU-GM were not affected in the same cultures; addition of irrelevant or anti-CSF-1 Ab had no effect on erythroid colonies (not shown).

Formation of erythroid colonies by purified BM CD34⁺ cells without pretreatment by exogenous cytokines. (See Fig. 2.) Purified CD34⁺ cells from healthy donors (not shown) and SE patients did not form EECs. Purified CD34⁺ cells from SE patients formed erythroid colonies with EPo but not with SCF alone; SCF plus EPo increased the number of erythroid colonies and allowed formation of large, BFU-E-derived colonies. Without or with SCF, no erythroid colony was formed without EPo when IL-11

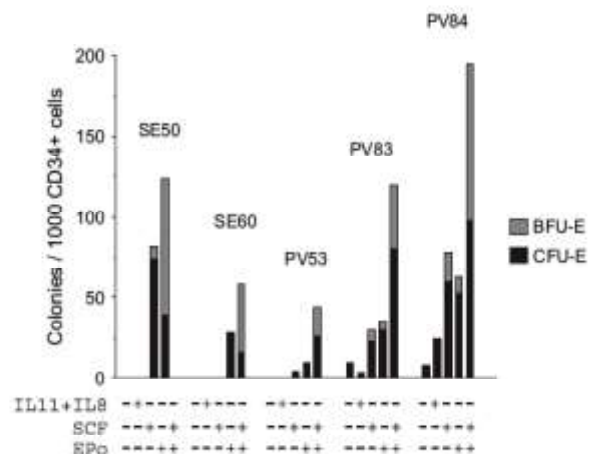


Figure 2. Formation of erythroid colonies by purified BM CD34⁺ cells. CD34⁺ cells purified from BMMCs of patients with SE (SE50 and SE60 expressed only wild-type JAK-2) or PV (PV83 and PV84 expressed V617F JAK-2; PV53 could not be tested for V617F JAK-2) were grown in duplicate in collagen gels without cytokine or with EPo (0.05 IU/mL), SCF, IL-11, or IL-8. After MGG staining, small and large erythroid colonies, derived from CFU-E and BFU-E, were scored and expressed as averages of duplicates.

and IL-8 were added in collagen cultures of purified SE CD34⁺ cells. In PV, purified CD34⁺ cells formed EECs (shown in Fig. 1E) in some, but not all, cultures; addition of SCF or EPo increased the number of erythroid colonies. SCF plus EPo further increased formation of CFU-E- and BFU-E-derived colonies. For PV84, addition of IL-11 and IL-8 increased the number of erythroid colonies formed without EPo. Possibly because of a copurification process [19], BMSCs were sometimes present in cultures of purified CD34⁺ cells (shown in Fig. 1C).

Pretreatment by IL-11 and IL-8. (See Fig. 3.) Purified BM CD34⁺ cells (one healthy donor, two SE, two PV) were grown in liquid cultures with SCF, IL-3, and IL-6 (Fig. 3A) plus IL-11 (Fig. 3B) or IL-8 (Fig. 3C) or both (Fig. 3D) for 6 days prior to colony assays. Under these conditions, treatment of normal or SE CD34⁺ cells with IL-11 or/and IL-8 allowed formation of small erythroid colonies with SCF alone. Treatment with IL-11 increased the number of small and large erythroid colonies in response to EPo and to SCF + EPo. Treatment with IL-8 did not affect the response to SCF + EPo. Anti-IL-11 Ab, tested in PV53 (not shown), completely inhibited formation of erythroid colonies by purified CD34⁺ cells; inhibition by anti-IL-8 Ab was partial (–36%). Anti-IL-11 Ab and anti-IL-8 Ab tested on purified SE CD34⁺ cells grown with SCF and EPo had no effect.

Formation of erythroid colonies by purified CD36⁺ progenitors

Six-day liquid cultures followed by purification of CD36⁺ cells and clonogenic assays were performed for 18 patients

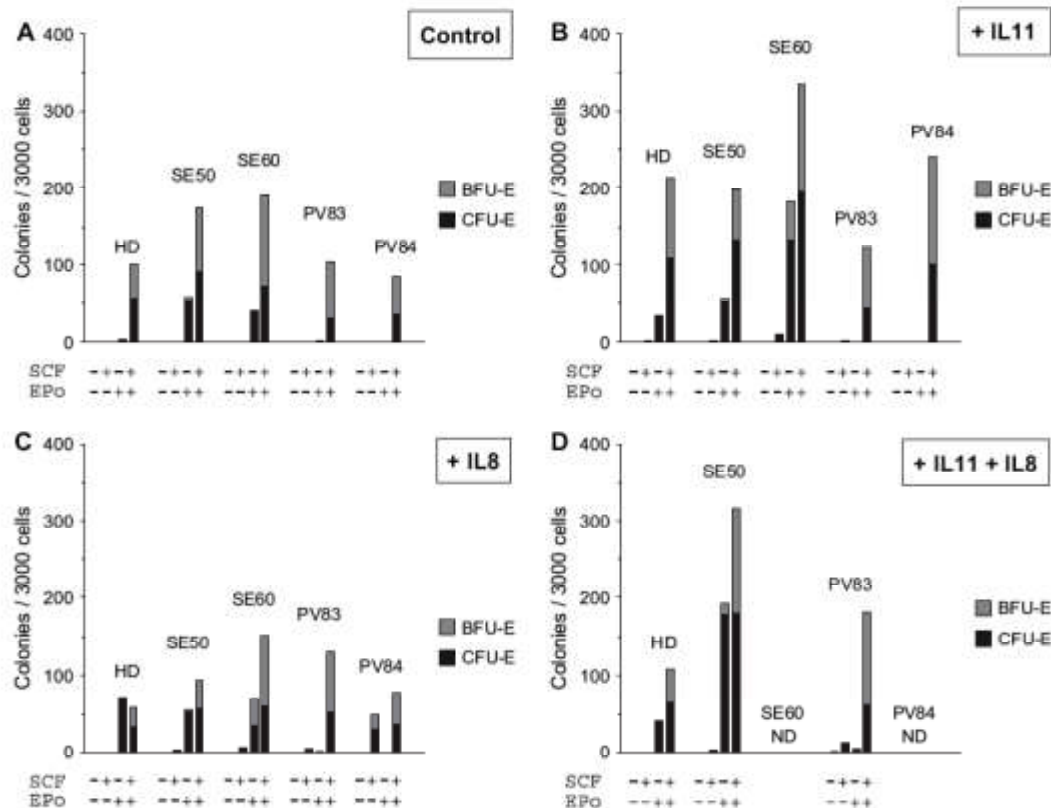


Figure 3. Formation of erythroid colonies by $CD34^+$ cells exposed to IL-11 and IL-8. $CD34^+$ cells purified from BMMCs of healthy donors and SE and PV patients were grown in liquid medium with SCF, IL-3, and IL-6 without (A) (= control) or with IL-11 (B) or IL-8 (C) or both cytokines (D) for 6 days. The cells were plated in duplicate in collagen gels and grown for 6 more days without cytokine or with SCF or EPO (0.05 IU/mL). Small and large erythroid colonies (presumably derived from CFU-E and BFU-E, respectively) were scored and expressed as averages of duplicates.

(seven SE, four IE, seven PV) and one healthy donor. Presumably, preparations of $CD36^+$ erythroid progenitors are made of CFU-E, plus some late ($CD34^+ CD36^+$) BFU-E.

Without exogenous cytokine. (See Fig. 4.) Without cytokine, purified $CD36^+$ erythroid progenitors of healthy donors (not shown), all SE and IE, and five PV did not form erythroid colonies; two PV formed one and two EECs/5000 $CD36^+$ cells. With SCF, erythroid colonies were not observed in cultures of healthy donors nor SE patients (Fig. 4A). Small colonies of mature erythroblasts, presumably CFU-E-derived (shown in Fig. 1F), were present in cultures of one IE (Fig. 4B) and six of the seven PV tested (Fig. 4C). With EPO, colonies of mature erythroblasts (shown in Fig. 1G) were present in all cultures except two SE. Large erythroid colonies, presumably derived from late BFU-E, were observed in SE and IE cultures when SCF + EPO were provided.

Effects of IL-11 and IL-8. (See Fig. 4.) IL-11 and IL-8 were tested in the 19 cultures of purified $CD36^+$ progenitors. Three representative cultures of each type of erythrocytosis

are shown. In a minority of cultures, IL-11 and IL-8 allowed (three SE, two IE) or increased (two PV) formation of erythroid colonies with SCF alone. In presence of EPO, or SCF + EPO, IL-11 and IL-8 enhanced formation of small, CFU-E-derived colonies in SE and IE but not in PV; large (BFU-E-derived) erythroid colonies were not affected. Erythroid colonies induced by EPO or SCF singly or together were not inhibited by anti-IL-11, anti-IL-8, anti-CXCR-1, or anti-CXCR-2 Abs, neither in PV nor in SE (not shown).

Pretreatment with IL-11 and IL-8 prior to $CD36^+$ cell purification. (See Fig. 5.) BMMCs from patient SE68 were grown for 6 days with SCF, IL-3, IL-6 without (control) or with IL-11 + IL-8 prior to $CD36^+$ cell purification and colony assays. No erythroid colony was formed with SCF or EPO by $CD36^+$ cells in control cultures. When BMMC were exposed to IL-11 + IL-8 prior to $CD36^+$ cell purification, small, CFU-E-derived colonies were observed with SCF alone. Large, BFU-E-derived colonies (seen only with SCF + EPO) were not affected by IL-11 nor IL-8.

Altogether, the data indicated that in PV, the large majority of $CD34^+$ (early) and all $CD36^+$ (late) progenitors were

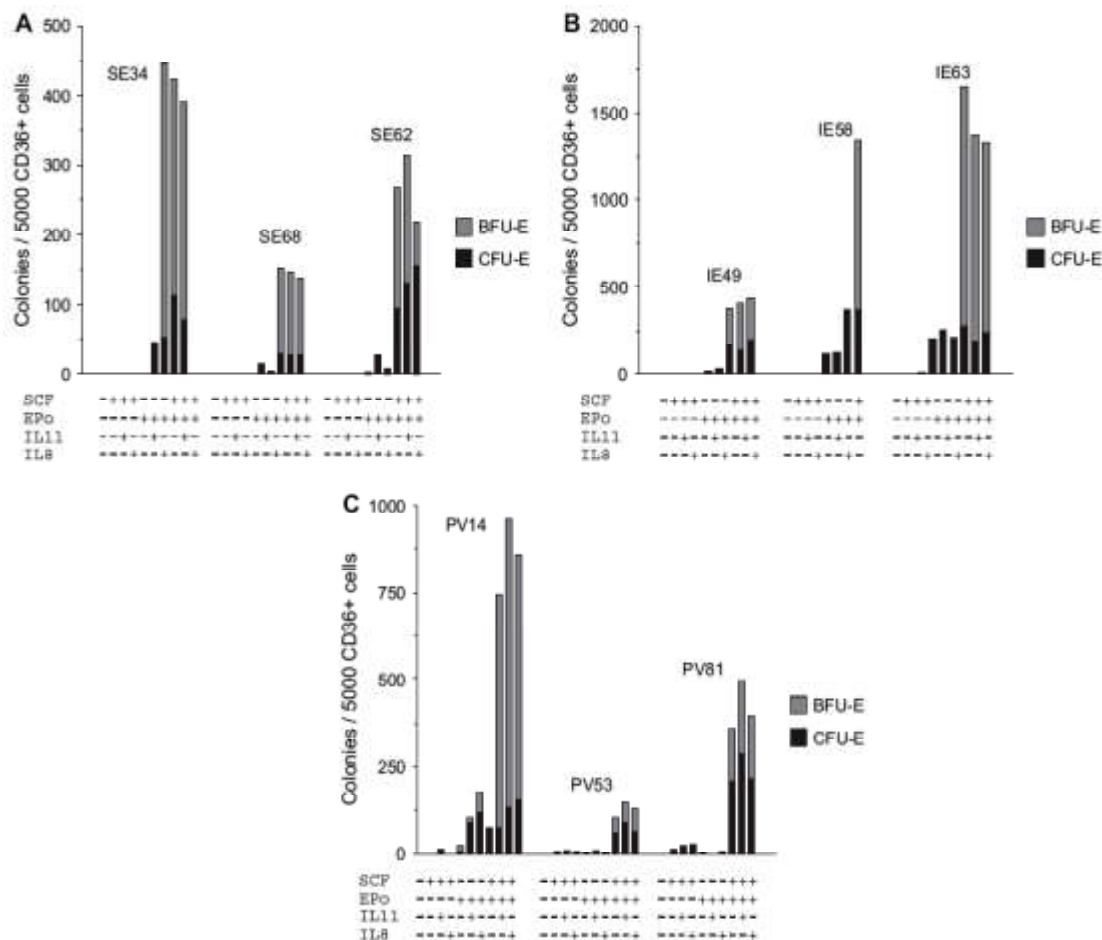


Figure 4. Formation of erythroid colonies by purified CD36⁺ progenitors. BMMCs from SE (A), IE (B), and PV (C) patients were grown for 6 days in liquid cultures in the presence of SCF, IL-3, and IL-6 prior to purification of CD36⁺ progenitors. Purified CD36⁺ cells were then plated in collagen gels without cytokine or with SCF, IL-11, IL-8, or Epo (0.05 IU/mL) for 6 more days. After MGG staining of the gels, erythroid colonies derived from CFU-E (small colonies of mature erythroblasts) and late BFU-E (large erythroid colonies) were scored and expressed as averages of duplicates or triplicates. Note: PV14, PV53, SE34, SE62, and IE63 could not be tested for expression of V617F JAK-2; however, 17/17 of the SE and IE tested expressed only wild-type JAK-2 and 21/21 of the PV tested expressed V617F JAK-2.

cytokine-dependent; only a small portion of PV CD34⁺ progenitors formed erythroid colonies without exogenous cytokines. PV CD36⁺ erythroid progenitors required SCF to survive and undergo differentiation without Epo. Exposure to IL-11 and IL-8 enhanced the capacity of PV early (CD34⁺) progenitors to generate colonies of mature erythroblasts with SCF alone and conferred Epo-independence to normal and SE progenitors.

Effects of IL-11 and IL-8 on SCF and Epo signaling in PV and SE erythroid cells

Because of insufficient material, signaling experiments could not be done in purified CD34⁺ or CD36⁺ progenitors; erythroblasts obtained from 12-day cultures of purified CD36⁺ cells were used instead. Activation of Stat-5 and ERK1/2 in response to Epo or/and SCF stimulation were analyzed by mean of their tyrosine and tyrosine/

threonine-phosphorylation status (See Fig. 6). No constitutive activation of Erk1/2 or Stat-5 was observed in PV or SE (Fig. 6A). In PV and SE, Epo had no effect on ERK1/2 but induced activation of Stat-5. This activation was inhibited by both IL-11 and IL-8 in PV and SE (Fig. 6A, left part). In response to SCF stimulation, only ERK1/2, not Stat-5, were activated in PV and SE erythroblasts (Fig. 6A, right part). Effects of IL-11 and IL-8 on SCF signaling were also evaluated: IL-11 inhibited SCF-induced activation of ERK1/2 in PV and SE, whereas IL-8 had an inhibitory effect only in PV. A clear synergy between SCF and Epo was observed in day 12 erythroblasts both in PV and SE: levels of activation of ERK1/2 were higher in the presence of SCF plus Epo than with SCF alone (Fig. 6B, lower blots). Epo-induced activation of Stat-5 was increased in presence of SCF (Fig. 6B, upper blots). Hence, PV and SE erythroblasts responded similarly to SCF and Epo in

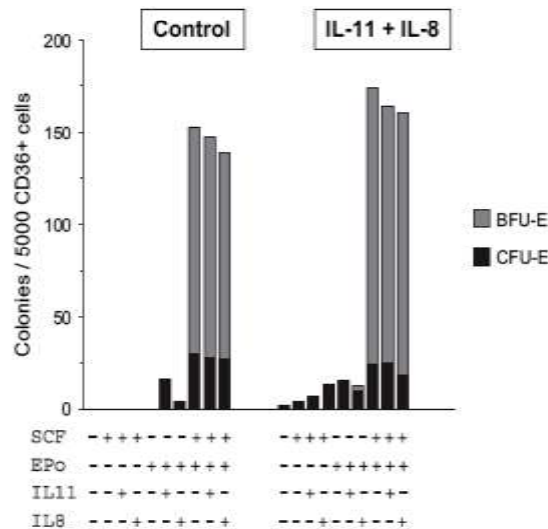


Figure 5. Formation of erythroid colonies by CD36⁺ progenitors exposed to IL-11 and IL-8. BMMCs of patient SE68 (negative for V617F JAK-2) were grown in liquid medium with SCF, IL-3, and IL-6 without (control) or with IL-11 + IL-8 for 6 days prior to purification of CD36⁺ progenitors. CD36⁺ cells were then grown for 6 days in duplicate in collagen without cytokine or with EPo, SCF, IL-11, or IL-8 to assay formation of erythroid colonies.

term of intracellular signaling. Furthermore, IL-11 and IL-8, which had positive effects on erythroid colony formation by early progenitors, had a negative effect on SCF and EPo signaling in erythroblasts.

Analysis of JAK-2 in PV and SE erythroid cells

Expression of the mutation V617F of JAK-2 has recently been described, mostly in neutrophils, for the majority (65–97%) of PV [4–7]. In our series, neutrophil cDNA of 21 (out of 23) PV and 17 (out of 21) SE and IE was available. Allele-specific quantitative PCR of neutrophil cDNA showed that 17/17 SE and IE expressed only wild-type JAK-2 whereas 21/21 PV expressed both wild-type and V617F JAK-2; in our series, PV patients showed similar levels of expression of wild-type and V617F JAK-2, with only four patients (PV11, PV22, PV81, PV84) expressing more V617F than wild-type JAK-2 (unpublished data). In addition, for five PV patients (PV8, PV14, PV66, PV165, PV168), JAK-2 was studied in erythroblasts obtained from four to six pooled erythroid colonies formed in vitro with SCF and EPo: erythroblasts of these five patients expressed both wild-type and V617F JAK-2 (Fig. 7A).

Because the V617F JAK-2 mutation has been described as an activating mutation leading to phosphorylation and consequently to activation of JAK-2 [4–7], we checked JAK-2 phosphorylation status in unstimulated erythroblasts obtained from 12-day cultures of purified CD36⁺ progenitors of three SE patients and three PV patients. The three PV patients expressed both wild-type and V617F.

JAK-2 in neutrophils and in erythroblasts. No constitutive activation of JAK-2 was detected in PV or SE erythroblasts (Fig. 7B). Consistent with these findings, Stat-5 was never found constitutively active either in SE or in PV erythroblasts (Figs. 6B and 7B). In PV as in SE, JAK-2 was phosphorylated on tyrosine in response to EPo but not to SCF, hence following the qualitative profile of activation of Stat-5 (not shown).

Discussion

Our study shows that PV EECs are dependent on cytokines and nonprogenitor cells. EECs (mostly colonies of mature erythroblasts) were observed reliably in PV cultures of BMMCs, inconstantly in cultures of purified BM CD34⁺ cells, and never in cultures of purified CD36⁺ progenitors. Hence, EECs occurred preferentially in cultures containing cytokine-secreting cells: macrophages, BMSCs, lymphocytes in cultures of BMMCs; BMSCs and endothelial cells in cultures of purified CD34⁺ cells [19]. Moreover, EECs formed by PV BMMCs or CD34⁺ cells represented less than 10% of erythroid colonies formed with SCF plus EPo. Addition of SCF alone raised numbers of “EPo-independent” erythroid colonies to 25 to 40% of colonies formed with SCF plus EPo. Purified PV CD36⁺ erythroid progenitors did not form colonies unless at least SCF was provided. In summary, in contrast to a previous report [20], both PV early (CD34⁺) and late (CD36⁺) erythroid progenitors remained strictly dependent on cytokines. Yet in the presence of SCF, PV CD36⁺ progenitors generated small colonies of mature erythroblasts without EPo, which was never observed in SE and IE.

The V617F mutation of JAK-2 recently found in a majority of MPDs and particularly in PV [4–7] should theoretically lead to constitutive activation of the tyrosine kinase and of STAT-5, and hereby to autonomous proliferation. Indeed, EECs were shown to express only the mutated form of JAK-2 [7], suggesting that expression of V617F JAK-2 in PV erythroid progenitors explained EPo independence. In our series, all SE and IE expressed only wild-type JAK-2, whereas all PV tested expressed both wild-type and V617F JAK-2; all PV in the series formed EECs. However, in PV erythroblasts expressing V617F JAK-2, no constitutive activation of the JAK-2/STAT-5 pathway was observed, as previously reported for PV platelets [21]. Correlation of the V617F mutation and tyrosine phosphorylation of JAK-2 is still unclear. Contrasting with the TEL-JAK-2 fusion protein, which causes constitutive activation of the tyrosine-kinase in T-cell leukemia [22], the effect of the V617F mutation on JAK-2 activity is less drastic. Depending on cellular context, V617F JAK-2 can induce a strong phosphorylation of JAK-2 in absence of exogenous stimuli in 293T cells [6] or a subtle effect in presence of low concentrations of cytokines or serum in hematopoietic cell lines such as UT-7 [4]. In our study, PV and SE erythroblasts responded similarly to SCF and

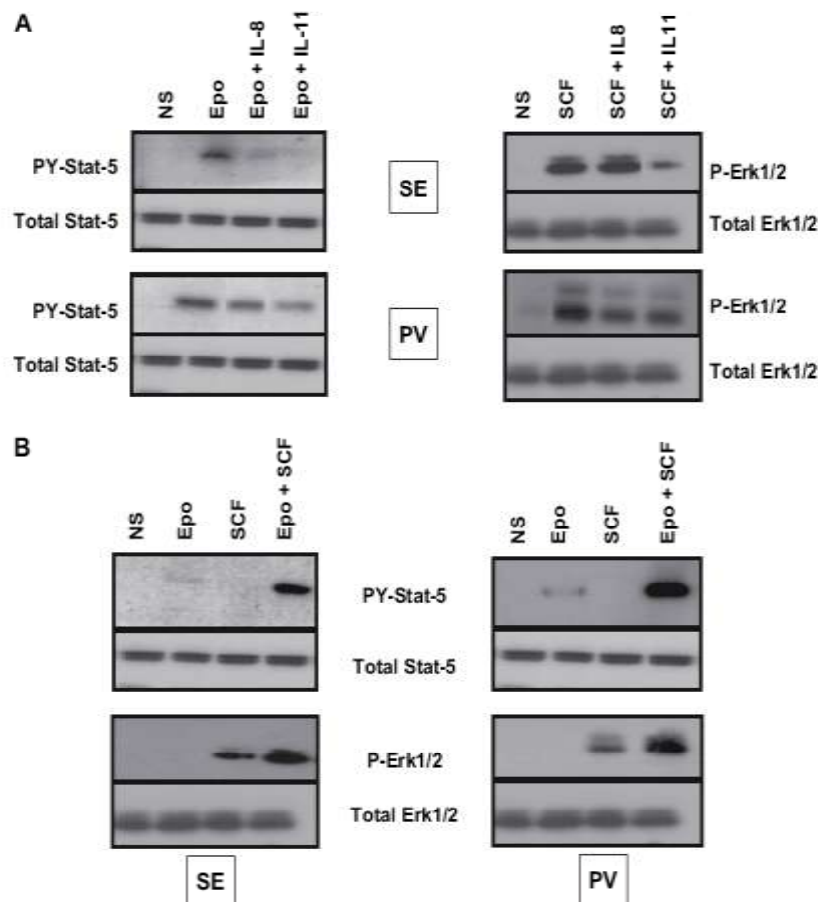


Figure 6. Effect of IL-11 and IL-8 on SCF and Epo signaling in PV and SE erythroblasts. Lysates were prepared from day 12 SE or PV CD36⁺ erythroblasts stimulated with Epo or SCF without or with IL-11 or IL-8 (A) or SCF plus Epo (B) (see Methods) and analyzed by Western Blot with anti-phospho ERK1/2 Ab and anti-phospho Stat-5 Ab. Blots were stripped and reincubated with anti-ERK1/2 and anti-Stat-5 Ab to evaluate total Stat-5 and ERK1/2. Erythroblasts of three PV and three SE patients were studied; for each pathology, identical results were obtained for the three patients and one typical experiment is shown. Blots in (A) and (B) are from different experiments, which explains variation in intensity of signal in blots (A) and (B) for the same stimulation.

Epo in terms of intracellular signaling, but a subtle effect of V617F JAK-2 would be masked by the relatively high concentrations of cytokines used. Hematopoietic cells expressing V617F JAK-2 seem to become hypersensitive to low concentrations of cytokines [4], a clear proliferative and survival advantage. It also appears that hematopoietic cells need external stimuli to fully express the V617F JAK-2-activated phenotype. In our conditions of intracellular signaling experiments, the fact that erythroblasts were deprived of cytokines for several hours may explain the absence of “constitutive” JAK-2 phosphorylation. More generally, *in vitro* cultures (of purified progenitors in particular) cannot reproduce exactly the *in vivo* BM environment and therefore may not allow expression of all the signaling and proliferation advantages bestowed on erythroid progenitors by V617F JAK-2. For instance, stimulation by BM cytokines may be necessary for full expression of the V617F JAK-2 phenotype.

The latter hypothesis is supported by several findings of this study. The importance of SCF, IL-11, and IL-8, three

cytokines produced by BMSCs, was evident in cultures of purified progenitors, notably CD34⁺ cells. First, SCF allowed formation of erythroid colonies without Epo by PV CD36⁺ progenitors, exposure to IL-11 and IL-8 conferred Epo-independence to normal, and SE CD34⁺ progenitors and IL-11 and IL-8 enhanced the capacity of PV progenitors to generate colonies of mature erythroblasts with SCF alone. Second, EECs and Epo-stimulated erythroid colonies were inhibited by anti-IL-11 Ab in PV cultures. “Epo-independent” erythroid colonies were also inhibited, to a lesser degree, by anti-IL-8 and anti-IL-8 receptor Ab. SCF dependence of PV erythroid progenitors was not established as anti-SCF Abs have no effect on PV erythroid colony formation; this could be an artifact of Ab efficiency or of culture conditions [10]. Third, upon cytokine binding, both SCF and IL-11 receptors interact with and stimulate JAK-2 phosphorylation [23,24]. Therefore, chronic *in vivo* exposure to high levels of IL-11, a cytokine overexpressed in PV [9,10], likely contributes significantly to the abnormal proliferation of PV erythroid progenitors.

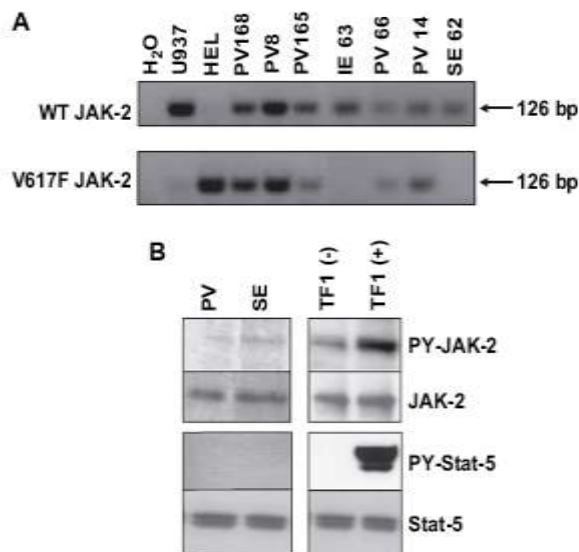


Figure 7. Analysis of JAK-2 expression and activation in PV erythroblasts. (A): Expression of JAK-2 by allele-specific PCR in five PV, one IE, and one SE performed on genomic DNA extracted from erythroid colonies formed by BM progenitors in presence of SCF and EPo. With this method, collection of some granulocytes and macrophages together with erythroid cells is likely. PCR products were run on a 1.5% agarose gel and stained with ethidium bromide. The cell lines U937 (expressing wild-type JAK-2 only) and HEL (expressing V617F JAK-2 only) were used as controls of specificity. (B): Expression of Phospho JAK-2 and Phospho Stat-5 in erythroblasts of SE and PV patients. Blots are representative of three PV and three SE tested. Cell lysates of unstimulated day 12 SE or PV erythroblasts were immunoblotted with anti-phosphotyrosine JAK-2 or anti-phosphotyrosine Stat-5. TF-1 cells unstimulated (–) or stimulated (+) 10 minutes with 50 ng/mL GM-CSF were used as positive control for phospho-JAK-2 and phospho-Stat-5 expression.

Indeed, our study highlighted that both IL-11 and IL-8 increased the number of BM progenitors responsive to EPo, and their ability to survive without EPo. The stimulating action of IL-11 and IL-8 on the formation of erythroid colonies was most evident on early ($CD34^+$) progenitors; it was observed for PV and normal progenitors. Importantly, IL-11 and IL-8 allowed normal BM progenitors to form erythroid colonies in vitro without EPo. As such colonies were typically infrequent, small, and made of mature erythroblasts, a plausible explanation is that IL-11 and IL-8 facilitated the in vitro survival and differentiation of late BFU-E and CFU-E already exposed to EPo in vivo. Remarkably, during cell differentiation IL-11 and IL-8 apparently switched from a positive action on early erythroid progenitors to a negative action on erythroblasts, where the two cytokines inhibited EPo-induced activation of STAT-5. As expression of EPo receptors decreases during erythroblast maturation, a negative signal may become activated by IL-11 to act as a brake on EPo-induced proliferation and differentiation, as described for IL-3 and oncostatin M [25,26]. Variations in expression of IL-11 and IL-8 receptors may also occur during erythroid differentiation, or in PV compared to SE. A different maturation schedule

of PV erythroid progenitors suggested by recent studies [20,27] could be another explanation.

Altogether, in serum-free, cytokine-free conditions no constitutive activation of the JAK-2/STAT-5 pathway was detected in PV erythroblasts expressing V617F JAK-2, and PV erythroid progenitors remained dependent on cytokines. PV appears to differ from SE by an improved survival of $CD34^+$ and $CD36^+$ erythroid progenitors after deprivation of essential cytokines (SCF, EPo) and by partial dependence of early progenitors on IL-11, a cytokine that allows survival of normal erythroid progenitors in the absence of EPo. The observation that anti-IL-11 Ab inhibits formation of PV erythroid colonies, and only in cultures containing nonhematopoietic cells actively secreting cytokines (BMMCs, $CD34^+$ cells), confirms the role played by the microenvironment and cytokines in malignant transformation [9,10,28,29].

Acknowledgments

We thank our colleagues of the Clinical Hematology Departments of the hospitals of Nantes, La Roche-sur-Yon, and Lorient for collecting samples. The study was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Loire-Atlantique) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC).

References

- Michiels JJ, Barbui T, Finazzi G, et al. Diagnosis and treatment of polycythemia vera and possible future study designs of PVSG. *Leuk Lymphoma*. 2000;36:239–253.
- Butcher C, D'Andrea RJ. Molecular aspects of polycythemia vera (review). *Int J Mol Med*. 2000;6:243–252.
- Spivak JL. Polycythemia vera: myths, mechanisms, and management. *Blood*. 2002;100:4272–4290.
- Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779–1790.
- James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005;434:1144–1148.
- Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cells*. 2005;7:387–397.
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365:1054–1061.
- Geissler K, Ohler L, Fodinger M, et al. Interleukin-10 inhibits erythropoietin-independent growth of erythroid bursts in patients with polycythemia vera. *Blood*. 1998;92:1967–1972.
- Hermouet S, Godard A, Pineau D, et al. Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythemia vera. *Cytokine*. 2002;20:178–183.
- Corre-Buscail I, Pineau D, Veau L, Boissinot M, Jacques Y, Hermouet S. Thrombosis-associated deregulation of bone marrow stroma-derived interleukin-11 in polycythemia vera. *Haematologica* (Submitted).
- Quesniaux VF, Clark SC, Turner K, Fagg B. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. *Blood*. 1992;80:1218–1223.

12. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KI, Dorner AJ. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia*. 1999;13:1307–1315.
13. Hermouet S, Corre I, Lippert E. Interleukin-8 and other agonists of G_i2 proteins: autocrine/paracrine growth factors for human hemopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors? *Leuk Lymphoma*. 2000;38:39–48.
14. Imbert M, Pierre R, Thiele J, Vardiman JW, Brunning RD, Flandrin G. Polycythemia Vera. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW, eds. World Health Organization (WHO) Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001. p. 32–34.
15. Freyssinier J-M, Lecoq-Lafon C, Amsellem S, Picard F, Ducrocq R, Mayeux P. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. *Br J Haematol*. 1999;106:912–922.
16. Dobo I, Mossuz P, Campos L, et al. Comparison of four serum-free, cytokine-free media for the analysis of endogenous erythroid colony (EEC) growth in polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET). *Hematol J*. 2001;2:396–403.
17. Dobo I, Donnard M, Girodon F, et al. Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assay performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythemia vera. *Hematol J*. 2004;5:161–167.
18. Dobo I, Boiret N, Lippert E, et al. A standardized endogenous megakaryocytic/erythroid (EMC/EEC) colony assay for the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica*. 2004;89:1203–1208.
19. Goan SR, Junghahn I, Wissler M, et al. Donor stromal cells from human blood engraft in NOD/SCID mice. *Blood*. 2000;96:3971–3978.
20. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004;32:179–187.
21. Moliterno AR, Hankins WD, Spivak JL. Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N Engl J Med*. 1998;338:572–580.
22. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, et al. A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*. 1997;14:1309–1312.
23. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, et al. JAK-2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood*. 1996;87:3688–3693.
24. Du X, Williams DA. Interleukin-11: review of molecular, cell biology and clinical use. *Blood*. 1997;89:3877–3908.
25. Magrangeas F, Boisteau O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative cross-talk between interleukin-3 and interleukin-11 is mediated by suppressor of cytokine signalling-3 (SOCS-3). *Biochem J*. 2001;353:223–230.
26. Magrangeas F, Boisteau O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative regulation of oncostatin M signaling by suppressor of cytokine signaling (SOCS-3). *Eur Cytokine Netw*. 2001;12:309–315.
27. Wickenhauser C, Perez F, Siebels U, et al. Structural, antigenic and transcriptional characteristics in peripheral blood CD34⁺ progenitor cells from polycythemia vera patients: evidence for delayed determination. *Int J Oncol*. 2003;23:437–443.
28. Bhowmick NA, Chytil A, Plieth D, et al. TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. *Science*. 2004;303:848–851.
29. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004;432:332–337.

ii. Conclusion et commentaires

Les résultats obtenus au cours de cette étude ont mis en évidence l'effet stimulant sur l'érythropoïèse de l'IL-11 et de l'IL-8 seules, ou associées. L'étude a confirmé la dépendance des progéniteurs de PV vis-à-vis des cytokines et notamment de l'IL-11 et de l'IL-8 mais aussi leur dépendance vis-à-vis des cellules du microenvironnement, productrices de cytokines, qu'elles soient hématopoïétiques ou non. En effet, on observe un plus grand nombre de colonies dans les cultures réalisées à partir de CMN contenant, en plus des progéniteurs, des macrophages, des cellules stromales et endothéliales, par comparaison avec les cultures de progéniteurs purifiés.

Nous avons également démontré que l'exposition prolongée *in vivo* à l'IL-11 favorise la prolifération anormale des progéniteurs érythroïdes. Tout d'abord, l'IL-11 permet la formation de colonies à partir de patients PS et de donneurs sains en absence d'Epo. Un anticorps neutralisant anti-IL-11 ajouté dans la culture inhibe la formation de CEE. Et enfin, suite à la liaison de leurs ligands respectifs, les récepteurs de l'IL-11 et du SCF activent JAK2 et contribuent donc à l'expression des caractères phénotypiques liés à la mutation.

La mutation JAK2V617F est une mutation activatrice qui devrait donc conduire à une phosphorylation constitutive de JAK2 et de sa cible STAT5. Dans la mesure où les CEE peuvent être homozygotes pour JAK2V617F, on pourrait penser que la mutation est responsable de la pousse indépendante de l'Epo. Cependant, dans notre série, nous n'avons pas observé d'activation constitutive de JAK2 ni de STAT5 dans les érythroblastes de PV (hétérozygotes pour la mutation) contrairement à ce qui avait été publié dans les plaquettes (Moliterno, Hankins et al. 1998). Depuis, des arguments en faveur d'un état hypersensible à l'activation de JAK2V617F (et non constitutif) ont été avancés. Il semblerait, en particulier, que la dimérisation du récepteur soit un pré-requis à l'activation de JAK2V617F (Lu, Huang et al. 2008). L'hypersensibilité des progéniteurs de PV aux très faibles taux de cytokines pourrait également être impliquée dans l'activation de JAK2V617F, en effet, les faibles taux de cytokines présents *in vivo* pourraient suffire à activer la kinase mutée. Dans notre étude, l'absence de détection d'activation constitutive de JAK2 s'expliquerait par le fait que les cellules ont été déprivées de cytokines plusieurs heures avant l'expérience.

Il semblerait enfin, que l'IL-11 et l'IL-8 possèdent des rôles différents en fonction du stade de l'érythropoïèse : effet stimulant de l'érythropoïèse précoce puis diminution de la réponse dans les stades tardifs. Cette variation peut être due soit à une modification de

l'expression des récepteurs IL-11R α , CXCR1 et 2 à la surface des cellules au cours de la maturation, soit au fait que les progéniteurs PV présentent un schéma de maturation différent de celui des progéniteurs normaux.

In vitro, l'ajout d'IL-11 et d'IL-8 (en absence de cytokines) ne restaure pas complètement la pousse des colonies obtenues quand elles sont ajoutées aux cytokines des conditions contrôles. On peut donc penser que d'autres facteurs et notamment des cytokines encore non identifiées, peuvent être dérégulées dans la PV et ainsi contribuer à l'érythropoïèse anormale caractéristique de la PV. Ceci est d'ailleurs le sujet de l'étude suivante.

Etude de la dérégulation de cytokines dans la polyglobulie de Vaquez : source de production, dépendance vis-à-vis de JAK2V617F et contribution à l'élévation de l'hématocrite.

6. Boissinot M, Corre I, Pineau D, Vilaine M, Jacques Y, Hermouet S
Activation of the IL-11/gp130/STAT3 pathway in Polycythemia Vera.

i. Introduction

Plusieurs études ont mis en évidence la dérégulation de la production de cytokines dans la PV, dont l'hyperproduction d'IL-11 (Hermouet, Godard et al. 2002; Ho, Lasho et al. 2007). De plus, la découverte de la mutation JAK2V617F, en 2005, a apporté de nouvelles questions quant à l'implication de cette mutation dans la régulation de la production de cytokines dans les SMP. La tyrosine kinase JAK2 agit en aval des récepteurs de cytokines hématopoïétiques, tels que l'EpoR, c-Mpl, le G-CSFR. Cependant dans la PV, les taux sériques d'Epo, de Tpo et de G-CSF sont normaux ou bas. Par ailleurs, JAK2 intervient dans la signalisation en aval de la chaîne commune des récepteurs de la famille IL-6 : la gp130.

Notre équipe a déjà mis en évidence la surproduction d'IL-11 dans le sérum et les surnageants de cultures progéniteurs et de cellules stromales de patients atteints de PV. Nous avons, donc dans cette étude, voulu déterminer si l'expression d'autres cytokines ou molécules de signalisation, liées à l'activation de JAK2, étaient dérégulées dans la PV. Pour cela, nous avons tout d'abord testé des pools de sérum et des pools de plasma médullaire de patients atteints de PV en comparaison avec des contrôles atteints de PS sur des membranes permettant la détection de 120 cytokines et récepteurs au total. Suite à cette étape, nous avons testé, par ELISA, les molécules apparues intéressantes (IL-11, HGF, TIMP-1, Leptine, MCP-1), individuellement chez chaque patient. Enfin, nous avons réalisé une étude par RT-qPCR sur les ADNc de différents types cellulaires de patients (cellules stromales, progéniteurs CD34+, érythroblastes GpA+, Lymphocytes CD3+). Dans cette dernière partie, nous avons, en plus des cytokines (IL-11, IL-6, HGF, TIMP-1), étudié l'expression de récepteurs (gp130 et c-Met : récepteur de l'HGF) et de molécules de signalisation (JAK2 forme sauvage et forme V617F, STAT3 et STAT5). Finalement, nous avons réalisé des études statistiques qui nous ont permis d'étudier les corrélations entre les niveaux d'expression de ces molécules et la mutation JAK2V617F, ainsi que de déterminer les sources principales de production.

Activation of an interleukin-11/gp130/STAT3 pathway in Polycythemia Vera erythroblasts

Marjorie Boissinot¹,
Mathias Vilaine¹,
Isabelle Corre¹,
Yannick Jacques¹,
Sylvie Hermouet^{1,2}

¹*INSERM UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France ;*

²*Laboratoire d'Hématologie, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes, France.*

Correspondance to :

Sylvie Hermouet, INSERM UMR 892, Institut de Biologie, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes, Cedex, France.

Phone: +33 2 40 08 40 51 ; Fax: +33 2 40 08 40 50 ; E-mail: sylvie.hermouet@chu-nantes.fr

Keywords: Polycythemia Vera / *JAK2V617F* / inflammation / cytokines / Hepatocyte Growth Factor (HGF) / Interleukin-11 (IL-11) / Interleukin-6 (IL-6)

Abstract

Using cytokine arrays and ELISAs (analyses of serum and bone marrow (BM) plasma) and quantitative RT-PCRs (analyses of purified cells: BM mesenchymal stromal cells (BMMSC), CD3⁺ lymphocytes, CD34⁺ progenitors, GPA⁺ erythroblasts), we investigated cytokine deregulation in PV patients compared to controls with idiopathic or secondary erythrocytosis. We found over-expression in PV of interleukin 11 (IL-11) and hepatocyte growth factor (HGF). The cytokines were mainly produced by BMMSC but also by erythroblasts, in which mRNA levels of IL-6, IL-11, HGF and its receptor, c-MET, were correlated. Compared to controls, PV erythroblasts expressed high mRNA levels of HGF, IL-11, gp130, the receptor chain common to IL-6 and IL-11, and STAT3, confirming activation of an IL-11/STAT3 pathway in these cells. In contrast, mRNA levels of c-MET, JAK2 and STAT5 were similarly high in PV and control erythroblasts. No correlation was found between cytokine or receptor and *JAK2-V617F* mRNA levels. Highlighting cooperation between the STAT3 and STAT5 pathways, STAT5 mRNA levels correlated with those of 4 STAT3-activating molecules, c-MET/HGF/IL-11/IL-6. Last, hematocrit correlated only with IL-11 levels in serum. Hence, the data suggest that *JAK2-V617F*-independent activation of an IL-11/STAT3 pathway in clonal erythroblasts contributes to the elevation of hematocrit in PV.

Abstract : 196 mots

Text : 3176 mots

Introduction

Polycythemia Vera (PV) is characterized by chronic, excessive production of erythrocytes associated with variable leukocytosis and thrombocytosis and the presence of the activating V617F mutation of *JAK2* (*JAK2-V617F*) (1-3). High expression of *JAK2-V617F* induced polycythemia in murine models (4-6). However, quantitative studies of patients at the time of diagnosis showed that the *JAK2-V617F* burden correlates positively only with leukocyte and neutrophil counts, not with hematocrit (7). Indeed, there is mounting evidence that onset of clonality and/or disease phenotype may be due to other molecular abnormalities (8-11). In patients, increased transcription of *JAK2* is typical of both secondary erythrocytosis (SE) (wild-type *JAK2*) and PV (wild-type and mutated *JAK2*) (7). Hence, chronic elevation of

hematocrit is associated with simultaneous high expression and activation of JAK2. However, multiple copies (>2 per cell) of the *JAK2* gene bearing the V617F mutation are found in a minority of PV patients (12). We hypothesized that the increased JAK2 activity associated with elevation of hematocrit may be induced by cytokines. Most are produced mainly by bone marrow (BM) mesenchymal stromal cells (BMMSC) but some are also produced by hematopoietic progenitors, which in PV remain cytokine-dependent (13-15). We used cytokine arrays to screen blood serum, BM plasma and culture supernatants of BMMSC from PV and SE patients for over-expression of pro-erythroid cytokines. The molecules identified were then studied at the protein and mRNA levels using ELISA and quantitative RT-PCRs in purified cells, and results were correlated with the *JAK2*-V617F allelic ratio (%*JAK2*-V617F) and blood cell counts. Signalling pathways were also investigated.

Materials and Methods

Patients. With consent, serum and/or BM plasma samples were obtained from 107 patients at the time of diagnosis (58 PV, 37 secondary erythrocytosis (SE), 12 idiopathic erythrocytosis (IE)). Diagnosis of PV was made according to WHO criteria (16,17). All PV had low serum erythropoietin (EPO) and endogenous erythroid colonies (EEC); all SE had high or normal serum EPO, no EEC and an identified cause of SE; IE patients had normal serum EPO and no EEC. *JAK2*-V617F status was established for 93/107 patients; 34/34 SE and 8/8 IE tested were negative; 48/51 PV tested were found positive for *JAK2*-V617F. Serum was also obtained from 17 healthy donors. Due to occasional insufficient sample collection, serum and BM assays were not performed for all patients.

Cell preparations. Adherent BMMSC were obtained after 12 days of culture in RPMI medium and 10% foetal bovine serum as described (15). Blood granulocytes were isolated from the lower interphase of a Ficoll density gradient (7,18). CD34⁺ cells (purity $\geq 95\%$), CD3⁺ lymphocytes (purity $\geq 98\%$) and GPA⁺ erythroblasts (purity $\geq 98\%$) obtained from frozen BM mononuclear cells (BMMC) were purified using Microbead kits (Miltenyi Biotec, Germany). All cells pellets were kept in 500 μ l Trizol (Invitrogen, Frederick, MD) and stored at -80°C until mRNA extraction.

Cytokine and signalling molecules studies. Cytokine profiles of serum and BM plasma, kept frozen at -80°C , were analysed using cytokine arrays VI and VII (Raybiotech, Inc.; the list of cytokines tested is shown in Annex 1) and ELISAs, following the manufacturers' instructions. Quantikine kits for IL-11 and IL-6 (R&D Systems, Abingdon, UK); IL-8, leptin and HGF EASIA kits (BioSource Europe); MCP-1 and TIMP-1 instant kits (Bender Medsystems,

Vienna, Austria). For mRNA studies, cells pellets kept in 500 µl Trizol were submitted to mRNA extraction. After DNase treatment and reverse transcription (RT), cDNAs were kept frozen at -80°C. qPCRs for TIMP-1, HGF, IL-11, IL-6, c-MET, gp130, STAT3, STAT5, as well as β-actin and RPLP, used as control genes, were performed with specific primers and probes (see Annex 1) on Rotorgene 3000 (Corbett Research, Australia). Dilutions of DNA preparations of pCR4-TOPO-TA constructs containing the relevant amplicons were used as copy number standards for qPCR assays. Results were expressed as mean numbers of copies per 1000 copies of RPLP0.

Quantification of *JAK2-V617F*. Genomic DNA was prepared using QiaAmp DNA mini-kit (Qiagen, Valencia, CA). *JAK2* allele-specific quantitative PCRs (AS-qPCRs) were performed as described (7,19).

Clonogenic assays. BFUE and CFU-GM assays in collagen-based medium were performed without cytokines or with stem cell factor (SCF, 25 ng/ml), hepatocyte growth factor (HGF, 2 ng/ml) or anti-HGF or irrelevant control antibody (2 µg/ml) using frozen blood or BMMC, as described (15,18).

Statistical analysis. Pearson's and Spearman's rank correlation tests were used to investigate potential relationship between cytokine levels, %*JAK2-V617F* and blood cell counts. The Mann-Whitney test was used to investigate differences in mRNA and protein levels. $P < 0.05$ was statistically significant.

Results

1. Detection of cytokines over-expressed in PV.

Cytokine arrays were used to detect over-expression of cytokines in pools of serum from PV patients, compared to healthy donors and SE patients, and pools of BM plasma from PV patients, compared to SE patients (Supplementary Figure 1). Serum from SE and PV patients differed from serum of healthy donors by high levels of IL-8, leptin and macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1). PV differed from SE by a high level of hepatocyte growth factor (HGF) in serum, and high levels of HGF and tissue inhibitor of metalloproteases-1 (TIMP-1) in BM plasma. The five molecules are linked to inflammation, as is IL-11, previously reported elevated in PV (20-22). IL-8, leptin, MCP-1, HGF, TIMP-1, plus IL-6, IL-11 and SCF were then measured in series of PV and SE patients using ELISAs (Table 1). Levels of MCP-1 were similar in PV and in SE. The level of leptin in serum, which could be studied only in male patients, was found lower in PV than in SE. PV TIMP-1 levels were

significantly elevated only in BM plasma. High serum and BM plasma levels of HGF, IL-11 and IL-8 in PV were confirmed. IL-11 was detected in BM plasma of 11/26 PV but in only 2/25 SE ($p=0.033$) and IL-11 levels were higher in PV than in SE, by 8 fold. Therefore, the rest of the studies focused on HGF and IL-11.

HGF and IL-11 are known to have positive effects on erythroid progenitor growth and the two molecules act sequentially: HGF induces production of IL-11, and also of TIMP-1, which inhibits cleavage and activation of HGF (15,20,23-25). Accordingly, serum levels of TIMP-1 and HGF, and BM plasma levels of IL-11, IL-6 and IL-8, were correlated, although weakly: TIMP-1/HGF, $n=32$, $r=0.42$, $p=0.02$; IL-11/IL-6: $n=29$, $r=0.51$, $p<0.01$; IL-11/IL-8: $n=60$, $r=0.43$, $p<0.01$. Interestingly, serum HGF levels correlated with blood counts of neutrophils ($n=21$, $r=0.71$, $p<0.005$). A weak correlation was found between serum IL-11 levels and hematocrit ($n=45$, $r=0.43$, $p<0.01$).

2. Sequential production of HGF, IL-11, IL-6 and IL-8 by PV BMMSC.

To confirm that HGF regulated expression of IL-11, which in turn may regulate expression of IL-6 and IL-8, we used BMMSC, which are major producers of cytokines linked to inflammation. ELISA performed on supernatants of 31 BMMSC cultures (12 PV, 5 IE, 14 SE) detected little HGF. In contrast, IL-11 and IL-8 were found at high levels in supernatants of PV BMMSC (Table 1), which produced on average 6 times more IL-11 and IL-8 than SE BMMSC. IL-11 and IL-8 levels were correlated ($n=31$, $r=0.74$, $p<0.01$). Fifteen BMMSC cultures (4 PV, 2 IE, 9 SE) were then stimulated either with HGF to study IL-11 production, or with IL-11 to study IL-6 and IL-8 production (Figure 1). HGF significantly increased IL-11 and TIMP-1 production by PV BMMSC (not shown) and IL-11 significantly increased the production of both IL-8 (Figure 1A) and IL-6 (Figure 1B). In the presence of IL-11, the median production per 1000 BMMSC per 48 hrs raised from 2.7 to 5.5 pg (+104%) for IL-8, and from 15.9 to 29.1 pg (+83%) for IL-6. Increases in IL-8 and IL-6 BMMSC production induced by IL-11 were similar in PV and SE cultures. Exposure to IL-8 had no effect on IL-11 and IL-6 production (not shown).

3. Analysis of cytokine mRNA expression in purified cells.

The data described above suggested that IL-11 and HGF may be produced by different cell types in PV. In addition to BMMSC, we studied CD3⁺ lymphocytes - recently described as IL-11 producers in PV (22), CD34⁺ progenitor cells and GPA⁺ erythroblasts purified from bone marrow of 6 PV patients and 7 control patients with SE and IE. The %*JAK2*-V617F measured in granulocyte DNA of PV patients ranged from 10% to 77%. Expression of HGF, IL-11 and IL-6 mRNAs was studied in purified cells using RT-qPCRs (Figure 2,

Supplementary Table 1). In PV and in SE, BMMSC were the main producers of HGF and IL-6 (Figure 2A). HGF and IL-6 mRNA levels were weakly correlated in PV BMMSC (n=16, $r=0.54$, $p=0.03$). Cytokine production by CD3⁺ lymphocytes (Figure 2B) and CD34⁺ progenitors (Figure 2C) was negligible. Compared to SE, PV GPA⁺ erythroblasts expressed significantly high levels of HGF and IL-11 mRNA (Figure 2D). An excellent correlation was found between mRNA levels of HGF, IL-11 and IL-6 in both PV and SE erythroblasts (n=5, $r=1.00$, $p<0.02$ for each) (Supplementary Table 1). No correlation was found between *JAK2*-V617F (% or mRNA levels) measured in each of the cell types studied and HGF, IL-11 or IL-6 mRNA levels.

4. Analysis of mRNA expression of receptors for HGF, IL-11 and IL-6, and other signalling molecules in purified cells.

Expression of c-MET, the HGF receptor; gp130, the receptor chain shared by IL-11 and IL-6; wild type *JAK2* and *JAK2*-V617F, STAT3 and STAT5 was analysed in purified BM progenitors and in BMMSC using RT-qPCRs (Figure 3). Compared to SE, PV GPA⁺ erythroblasts expressed high mRNA levels of gp130 and STAT3, consistent with activation of STAT3 via IL-11/IL-6/gp130 in these cells. In contrast, mRNA levels of c-MET, *JAK2* and STAT5 were similar in PV and SE erythroblasts. No correlation was found with *JAK2*-V617F mRNA levels. In PV erythroblasts, c-MET, HGF, IL-11 and IL-6 mRNA levels were correlated and the 4 STAT3-activating molecules correlated negatively with total *JAK2* and positively with STAT5 (Supplementary Table 1). As expected, PV CD34⁺ progenitors expressed more STAT3 than STAT5 but there was no significant difference in mRNA levels of STAT3, STAT5, *JAK2*, c-MET and gp130 between PV and SE CD34⁺ cells. No difference in expression of the 5 molecules was observed between PV and SE in BMMSC and CD3⁺ lymphocytes. There was also no correlation in PV and SE between STAT5, STAT3 and c-MET mRNA levels, nor between HGF, IL-11, IL-6 and *JAK2* mRNA levels in CD34⁺ cells, BMMSC or CD3⁺ cells (Supplementary Table 1).

5. Analyses of erythroid cell lines depending on *JAK2* status.

Similar studies were performed in 5 human erythroid cell lines, UT-7, TF-1 and K562 (*JAK2*-V617F-negative) and UKE-1 and HEL (homozygous for *JAK2*-V617F). As shown in Figure 4, cytokine expression varied among cell lines, independently of their *JAK2*-V617F status. mRNA levels of the three cytokines were low in UKE-1, UT-7 and TF-1 cells and high in HEL cells, particularly for HGF. K562 cells, which express BCR-ABL, revealed high levels of IL-6 and IL-11 mRNAs but very low levels of HGF mRNAs. Consistently, IL-11 and IL-6

mRNA levels were correlated ($n=5$, $r=1.00$, $p=0.017$), but did not correlate with HGF mRNA levels. ELISA confirmed the production of HGF and IL-11 by HEL cells (data not shown). Expression of c-MET, gp130, JAK2, STAT3 and STAT5 was also studied (Figure 5). Expression of c-MET was high in HEL and K562 cells, low in the 3 other cell lines. K562 expressed >10 fold more gp130 mRNA than the other cell lines. In the five cell lines, gp130 mRNA levels correlated with STAT3 ($r=1.00$, $p<0.01$), STAT5 expression was high in HEL and TF-1 cells only. Last, mRNA expression of total JAK2 was high in UT-7 (*JAK2-V617F*-negative cell line, with low IL-11 and IL-6 mRNA expression), in K562 (*JAK2-V617F*-negative cell line, with high IL-11 and IL-6 mRNA expression) and in HEL (100% *JAK2-V617F* cell line, with high IL-11 and IL-6 mRNA expression). mRNA expression of total JAK2 was low in UKE-1 (100% *JAK2-V617F* cell line, with very low levels of HGF/IL-11/IL-6 mRNAs) and in TF-1 (*JAK2-V617F*-negative cell line, with low HGF/IL-11/IL-6 mRNA expression). One explanation for the high *JAK2* expression in HEL cells was their number (>2/cell) of chromosomes 9p, which carry *JAK2* genes, as well as duplication of mutated *JAK2* genes. However, the highest *JAK2* mRNA levels were found in K562 cells and in EPO-dependent UT-7 cells.

These results, summarized in Table 2, were consistent with the constitutive activation of an IL-11/IL-6/STAT3 pathway in PV erythroblasts and in erythroid cell lines, independently of *JAK2-V617F*. Of note, high mRNA levels of IL-11 and IL-6, associated with high expression of c-MET, HGF and JAK2, a characteristic of PV erythroblasts, was found only in HEL cells.

6. Effect of HGF and anti-HGF antibodies on erythroid colony formation by PV progenitors.

We previously reported that PV erythroid progenitors were partially dependent on IL-11, as neutralizing anti-IL-11 antibody (Ab) could block *in vitro* BFU-E and CFU-E growth in cultures of BM mononuclear cells (BMMC) from PV patients (15). BMMC from 4 PV patients were grown *in vitro* with HGF and anti-HGF Ab. Addition of HGF or anti-HGF Ab had no effect on the formation of endogenous colonies, erythroid (EEC) or megakaryocytic (EMC), nor on the formation of BFU-E, CFU-GM and CFU-M colonies in the presence of cytokines (data not shown).

Discussion

The study provides evidence of the deregulation in PV erythroblasts of a cascade of cytokines - HGF, IL-11, IL-6 - and of a receptor common to IL-11 and IL-6 - gp130. All are known stimulants of myeloid hematopoiesis via activation of STAT3. We also provide evidence that overexpression of IL-11 and STAT3 is likely independent from *JAK2-V617F*. IL-11 deregulation in PV erythroblasts is highly relevant to PV pathogenesis, as hematocrit correlated only with serum IL-11 levels. Altogether, these observations are consistent with a yet unidentified molecular event in PV, likely independent of *JAK2-V617F*, leading to activation of STAT3 via IL-11/IL-6 in erythroblasts and contributing to their excessive proliferation.

Deregulation of HGF, IL-11 and IL-6 has been described in another hematological malignancy, multiple myeloma (26,27). As in malignant plasma cells, both HGF and its tyrosine kinase receptor, c-MET, were found expressed at high levels in PV erythroblasts, which also over-expressed simultaneously IL-11 and its receptor, gp130. Of note, HGF, IL-11 and IL-6 mRNAs were also over-expressed in PV BMMSC, possibly in response to paracrine stimulation by HGF and IL-11 produced by PV progenitors. Indeed, mRNA levels of HGF, IL-11 and IL-6 were correlated only in PV erythroblasts but exposure of BMMSC to HGF stimulated their production of IL-11, which in turn induced secretion of IL-6 and IL-8. We also found high levels in PV of TIMP-1, a molecule that negatively controls HGF activity, and recently reported over-expressed in another MPD, primary myelofibrosis. Over-expression of IL-6 by megakaryocytes had been reported in PV (28-30). Thus, as represented in Figure 6, at least two autocrine/paracrine HGF/IL-11/IL-6 loops co-operate in PV bone marrow: one concerns BMMSC, the main producers of HGF; the other concerns erythroblasts, the main producers of IL-11; others progenitors, such as megakaryocytes, not studied here, may also be concerned.

The *JAK2-V617F*-independence, if confirmed, of over-expression of HGF, IL-11, gp130 and STAT3 in PV erythroblasts is not unexpected. An increase in HGF production is a common cellular response to hypoxia, mediated by hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and it is now established that some cases of congenital and familial polycythemia are caused by mutations of genes of the oxygen sensing pathway, notably HIF-1 (31-33). This pleads for a physiological role of HGF as a regulator of erythropoiesis. In other cell systems, the action of HGF in cell scattering, metastasis and notably, in reduction of apoptosis via activation of STAT3, are established. Of note, IL-11 and IL-6 also regulate cell survival and prevention of apoptosis via STAT3. In addition to multiple myeloma cells, many solid tumors appear to be

dependent on sustained c-MET activity for their growth and survival, and c-MET mutations are not rare in human cancers. In consequence, c-MET and HGF have become novel targets in cancer therapy (34-38).

c-MET belongs to a family of so-called “dependence receptors”, which induce cell death unless they are activated by their ligand (34,39). Disturbing the equilibrium between ligand and receptor, either by over-expression of ligand or by deletion or inactivation of the receptor, leads to inappropriate cell survival, excessive cell proliferation, accumulation of genetic abnormalities and eventually, cell transformation (39). In PV erythroblasts, both c-MET and HGF were expressed at high levels, which may lead to activation of STAT3, either directly or via increased autocrine production of IL-11 and IL-6 and their receptor, gp130. Consistent with balanced cooperation between the STAT3 (cell survival) and STAT5 (proliferation and differentiation) pathways, c-MET/HGF/IL-11/IL-6 and STAT5 mRNA levels correlated positively in PV erythroblasts. Accordingly, others have reported over-expression in PV of SOCS3, a negative regulator of signalling of both IL-11, activator of JAK2/STAT3, and EPO, activator of JAK2/STAT5 (40).

The present study did not address the cause(s) of the over-stimulation of the IL-11/IL-6/STAT3 pathway in PV, which might be multiple but likely depend(s) on a combination of an intrinsic molecular abnormality and external stimulation by HGF and other cytokines produced by BMMSC and other cells of the BM micro-environment (Figure 6). HGF-mediated activation of the IL-11/IL-6/STAT3 pathway may vary during erythroid differentiation, and one cannot exclude that the stages of differentiation attained by GPA⁺ erythroblasts might differ in PV and in SE. Differentiation-dependent or not, it seems unlikely that activation of the IL-11/IL-6/STAT3 pathway is a consequence of *JAK2-V617F*, as no correlation was found in patient erythroblasts and in UKE-1 and HEL cells between *JAK2-V617F* and HGF/IL-11/IL-6 expression. Up-regulation of c-MET mRNA expression in presence of high levels of HGF in PV erythroblasts could be sufficient to allow chronic over-stimulation of the STAT3 pathway. Located on the long arm of chromosome 7, frequently mutated in cancer and deleted in myeloid malignancies, c-MET seems a good target. One may also consider the possibility of acquired activating mutations of genes of the oxygen-sensing pathway leading to increased HGF expression. The genes encoding receptors for IL-11 and IL-6 - specific alpha chains, common gp130 chain - are other possible candidates. Using animal models, Jenkins et al. (41,42) convincingly demonstrated that a threshold of gp130-dependent STAT3 signalling is critical for normal regulation of hematopoiesis and that abnormal gp130-induced activation of the STAT3 pathway leads to clinical and biological

features typical of MPD. Interestingly, in mice disruption of STAT3 activity via gp130 resulted in increased IL-11 and IL-6 expression; expression of HGF and c-MET was not studied. Over-stimulation of the STAT3 pathway signalling would presumably reduce cell apoptosis and predispose cell to mutations (39). In any case, the cause(s) leading to HGF/IL-11/gp130/STAT3 over-expression in PV could be either primary - pre- *JAK2-V617F* - events, or “passenger” events, occurring before or after *JAK2-V617F*, as already reported in MPDs (9).

In summary, we provided evidence in PV of activation of the HGF/c-MET and IL-11/gp130/STAT3 pathways, which contributes to the expansion of clonal erythroblasts and to the elevation of hematocrit and is likely *JAK2-V617F*-independent. The molecular event(s) responsible for increased expression of HGF, IL-11, gp130 and STAT3, remain(s) to be identified. Blocking c-MET, HGF/IL-11/IL-6 production and STAT3 activation might be of interest in the treatment of PV, as reported in multiple myeloma and other malignancies (35-38).

Acknowledgements. We are indebted to Mrs. Danielle Pineau for excellent technical help and to colleagues of the Clinical Hematology Departments of the hospitals of Nantes, La Roche-sur-Yon and Lorient for providing patient samples, and to Dr. Eric Lippert for critical reading of the manuscript. The study was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité de Loire-Atlantique) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC). MB has been the recipient of scholarships from the French Ministry of Research (2005, 2006, 2007) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC) (2008).

Figure Legends.

Figure 1: Cytokine secretion by BMMSC of SE and PV patients.

Adherent BM mononuclear cells (BMMC) were grown *in vitro* for 12 days weeks in RPMI and 10% foetal bovine serum (BMMSC), then scraped and pelleted for mRNA studies, or stimulated with IL-11 for 48 hrs prior to culture supernatant collection for ELISA assays. IL-6 and IL-8 were measured using the Quantikine kit for human IL-6 (R&D Systems, Abingdon, UK) and the IL-8 EASIA kit (BioSource Europe). A: IL-8 secretion; B: IL-6 secretion.

Figure 2: Cytokine mRNA expression in BMMSC, CD3⁺ lymphocytes, CD34⁺ cells and GPA⁺ erythroblasts of SE and PV patients.

Data shown are means of at least 3 determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used to analyse data; $p < 0.05$ was statistically significant. A: BMMSC; B: purified CD34⁺ cells; C: purified CD3⁺ cells; D: purified GPA⁺ erythroblasts.

Figure 3: mRNA expression of c-MET, gp130, JAK2, STAT3 and STAT5 in BMMSC, CD3⁺ lymphocytes, CD34⁺ cells and GPA⁺ erythroblasts of SE and PV patients.

Data shown are means of at least 3 determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used to analyse data; $p < 0.05$ was statistically significant. A: BMMSC; B: purified CD34⁺ cells; C: purified CD3⁺ cells; D: purified GPA⁺ erythroblasts.

Figure 4: Cytokine mRNA expression in erythroid cell lines.

Data shown are means of at least 3 determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used to analyse data; $p < 0.05$ was statistically significant. A: IL-11; B: IL-6; C: HGF.

Figure 5: mRNA expression of c-MET, gp130, JAK2, STAT3 and STAT5 in erythroid cell lines.

Data shown are means of at least 3 determinations. Mann-Whitney's rank sum test was used to analyse data; $p < 0.05$ was statistically significant. A: c-MET; B: gp130; C: total JAK2; D:STAT3; E: STAT5.

Figure 6: Model for interactions between HGF, IL-11 and IL-6 in the bone marrow of PV patients and activation of the STAT3/STAT5 pathways.

HGF, IL-11 and IL-6, mainly produced by BMMSCs (HGF, IL-6) and GPA⁺ erythroblasts (IL-11), act as autocrine/paracrine factors and activate the JAK2/STAT3 pathway. This activation is independent of *JAK2-V617F* and likely contributes to abnormal hematopoiesis in PV. The mechanism of TIMP-1 inhibition of HGF release and activation is also described.

References

1. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144-1148.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR. Cancer Genome Project. Cancer Genome Project. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK-2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005; 365: 1054-1061.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK-2 in myeloproliferative disorders. *New Engl J Med* 2005; 352: 1779-1790.
4. Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, Gachelin FM, Vainchenker W, Villeval JL. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* 2006; 108: 1652-1660.
5. Wernig G, Mercher T, Okabe R, Levine RL, Lee BH, Gilliland DG. Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model. *Blood* 2006; 107: 4274-4281.
6. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, Skoda RC. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. *Blood* 2008; 111: 3931-3940.
7. Lippert E, Boissinot M, Kralovics R, Girodon F, Dobo I, Praloran V, Boiret-Dupré N, Skoda RC, Hermouet S. The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood* 2006; 108: 1865-1867.
8. Bellane-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, Delhommeau F, Casadevall N, Vainchenker W, Thomas G, Najman A. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. *Blood* 2006; 108: 346-352.
9. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, Talmant P, Tichelli A, Hermouet S, Skoda RC. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. *Blood* 2007; 110: 375-379.

10. Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007; 6: 550-566.
11. Schaub FX, Jäger R, Looser R, Hao-Shen H, Hermouet S, Girodon F, Tichelli A, Gisslinger H, Kralovics R, Skoda RC. Clonal analysis of deletions on chromosome 20q and *JAK2*-V617F in MPD suggests that del20q acts independently and is not one of the pre-disposing mutations for *JAK2*-V617F. *Blood* 2008; submitted
12. Najfeld V, Cozza A, Berkofsky-Fessler W, Prchal J, Scalise A. Numerical gain and structural rearrangements of *JAK2*, identified by FISH, characterize both *JAK2*V617F-positive and -negative patients with Ph-negative MPD, myelodysplasia, and B-lymphoid neoplasms. *Exp Hematol* 2007; 35: 1668-7166.
13. Geissler K, Ohler L, Fodinger M, Kabrna E, Kollars M, Skoupy S, Lechner K. Interleukin-10 inhibits erythropoietin-independent growth of erythroid bursts in patients with polycythemia vera. *Blood* 1998; 92: 1967-1972.
14. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N, Vainchenker W, Casadevall N. Multiple signalling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol* 2004; 32: 179-187.
15. Corre-Buscail I., Pineau D., Boissinot. M, Hermouet, S. Erythropoietin-independent erythroid colony formation by bone marrow progenitors exposed to interleukins 11 and 8. *Exp Hematol* 2005; 33: 1299-1308.
16. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002; 100: 2292-2302.
17. Imbert M, Pierre R, Thiele J, Vardiman JW, Brunning RD, Flandrin G. Polycythemia Vera. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. (eds.) World Health Organization (WHO) classification of tumours: Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France. IARC Press. 2001; 32-34.
18. Dobo I, Donnard M, Girodon F, Mossuz P, Boiret N, Boukhari R, Allégraud A, Campos L, Bascans E, Pineau D, Turlure P, Praloran V, Hermouet S. Standardization and comparison of endogenous erythroid colony assay performed with bone marrow or blood progenitors for the diagnosis of polycythaemia vera. *Hematol J* 2004; 5: 161-167.
19. Boissinot M, Garand R, Hamidou M, Hermouet S. The *JAK2*-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood* 2006; 108: 1781-1782.

20. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia* 1999; 13: 1307-1315.
21. Hermouet S, Godard A, Pineau D, Corre I, Raher S, Lippert E, Jacques Y. Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythemia vera. *Cytokine* 2002; 20: 178-183.
22. Ishii T, Zhao Y, Shi J, Sozer S, Hoffman R, Xu M. T cells from patients with polycythemia vera elaborate growth factors which contribute to endogenous erythroid and megakaryocyte colony formation. *Leukemia* 2007; 21: 2433-2441.
23. Quesniaux VF, Clark SC, Turner K, Fagg B. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. *Blood* 1992; 80: 1218-1223.
24. Matsuda-Hashii Y, Takai K, Ohta H, Fujisaki H, Tokimasa S, Osugi Y, Ozono K, Matsumoto K, Nakamura T, Hara J. Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor. *Exp Hematol* 2004; 32: 955-961.
25. Lambert E, Boudot C, Kadri Z, Soula-Rothhut M, Sowa ML, Mayeux P, Hornebeck W, Haye B, Petitfrere E. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival. *Biochem J* 2003; 372: 767-774.
26. Derksen PW, de Gorter DJ, Meijer HP, Bende RJ, van Dijk M, Lokhorst HM, Bloem AC, Spaargaren M, Pals ST. The hepatocyte growth factor/Met pathway controls proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Leukemia* 2003; 17: 764-774.
27. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Rizzoli V. The RANK/RANK ligand system is involved in interleukin-6 and interleukin-11 up-regulation by human myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Haematologica* 2004; 89: 1118-1123.
28. Ho CL, Lasho TL, Butterfield JH, Tefferi A. Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders. *Leuk Res* 2007; 31: 1389-1392.
29. Wickenhauser C, Thiele J, Lorenzen J, Schmitz B, Frimpong S, Schramm K, Neumann I, Zankovich R, Fischer R. Polycythemia vera megakaryocytes but not megakaryocytes from normal controls and patients with smoker's polycythemia spontaneously express IL-6 and IL-6R and secrete IL-6. *Leukemia* 1999; 13: 327-334.
30. Panteli KE, Hatzimichael EC, Bouranta PK, Katsaraki A, Seferiadis K, Stebbing J, Bourantas KL. Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *British J Haematol* 2005; 130: 709-715.
31. Lee FS, Percy MJ, McMullin MF. Oxygen sensing: recent insights from idiopathic erythrocytosis. *Cell Cycle* 2006; 5: 941-945.

32. Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1363-1371.
33. Kitajima Y, Ide T, Ohtsuka T, Miyazaki K. Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 2008; 99: 1341-1347.
34. Shinomiya N, Gao CF, Xie Q, Gustafson M, Waters DJ, Zhang YW, Vande Woude GF. RNA interference reveals that ligand-independent MET activity is required for tumor cell signalling and survival. *Cancer Res* 2004; 64: 7962-7970.
35. Sattler M, Salgia R. c-MET and hepatocyte growth factor: potential new targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep* 2007; 9: 102-108.
36. Du W, Hattori Y, Yamada T, Matsumoto K, Nakamura T, Sagawa M, Otsuki T, Niikura T, Nukiwa T, Ikeda Y. NK4, an antagonist of hepatocyte growth factor (HGF), inhibits growth of multiple myeloma cells: molecular targeting of angiogenic growth factor. *Blood* 2007; 109: 3042-3049.
37. Stellrecht CM, Phillip CJ, Cervantes-Gomez F, Gandhi V. Multiple myeloma cell killing by depletion of the MET receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* 2007; 67: 9913-9920.
38. Comoglio PM, Giordano S, Trusolino L. Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 504-516.
39. Bernet A, Mehen P. Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression. *Bull Cancer* 2007; 94: E12-17.
40. Kralovics R, Teo SS, Buser AS, Brutsche M, Tiedt R, Tichelli A, Passamonti F, Pietra D, Cazzola M, Skoda RC. Altered gene expression in myeloproliferative disorders correlates with activation of signaling by the V617F mutation of Jak2. *Blood* 2005; 106: 3374-3376.
41. Jenkins BJ, Roberts AW, Najdovska M, Grail D, Ernst M. The threshold of gp130-dependent STAT3 signalling is critical for normal regulation of hematopoiesis. *Blood* 2005; 105: 3512-3520.
42. Jenkins BJ, Roberts AW, Greenhill CJ, Najdovska M, Lundgren-May T, Robb L, Grail D, Ernst M. Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis. *Blood* 2007; 109: 2380-2388.

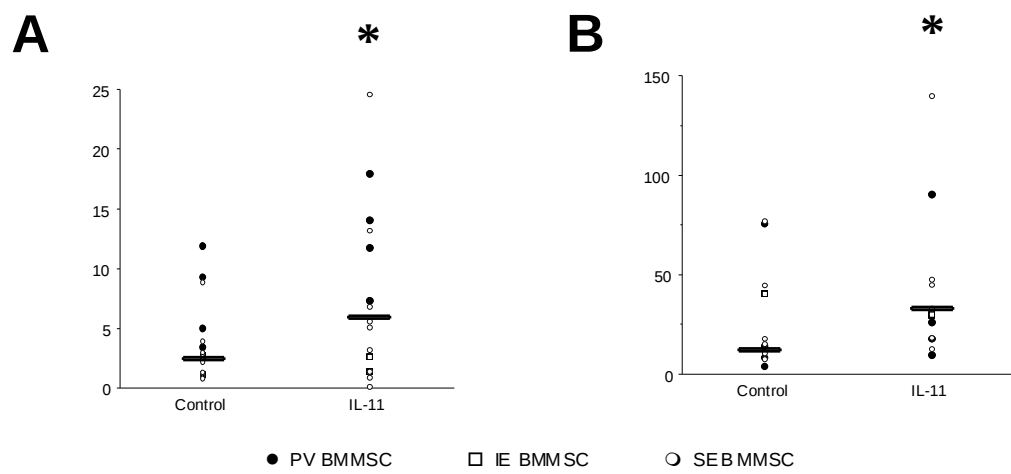
Table 1: Cytokine levels in serum, BM plasma and BMMSC supernatants of patients with polycythemia.

		SERUM (pg/ml)			BM PLASMA (pg/ml)			BMMSC (pg/1000 BMMSC/48 hrs)		
CYTOKINE		SE	IE	PV	SE	IE	PV	SE	IE	PV
IL-11	Nbr	20	10	32	25	12	26	14	5	12
	Mean $\pm$ SD	0.5 $\pm$ 2.4	2.1 $\pm$ 4.8	99.1 $\pm$ 443	1.0 $\pm$ 4.4	3.4 $\pm$ 8.2	8.4* $\pm$ 13.3	2.2 $\pm$ 2.1	3.7 $\pm$ 3.3	13.0* $\pm$ 15.1
IL-8	Nbr	17	10	31	26	12	23	13	5	12
	Mean $\pm$ SD	1196** $\pm$ 2311	1457** $\pm$ 3062	2566** $\pm$ 4518	770 $\pm$ 1195	1599 $\pm$ 1619	3665* $\pm$ 5040	4.4 $\pm$ 4.2	4.8 $\pm$ 4.8	26.5* $\pm$ 31.8
IL-6	Nbr	9	6	13	11	8	10	6	4	7
	Mean $\pm$ SD	25.6 $\pm$ 72.2	5.9 $\pm$ 6.1	166 $\pm$ 473	2275 $\pm$ 3123	6799 $\pm$ 12180	6259 $\pm$ 13057	59.2 $\pm$ 66.4	46.2 $\pm$ 31.7	74.7 $\pm$ 87.3
SCF	Nbr	8	4	10	10	5	9	ND	ND	ND
	Mean $\pm$ SD	651 $\pm$ 170	699 $\pm$ 225	643 $\pm$ 131	570 $\pm$ 206	635 $\pm$ 77	488 $\pm$ 95.3			
HGF	Nbr	34	ND	49	26	ND	26	6	ND	11
	Mean $\pm$ SD	1765 $\pm$ 987		5176* $\pm$ 3071	4438 $\pm$ 4544		7929* $\pm$ 4786	8 $\pm$ 5		17 $\pm$ 22
Leptin (men only)	Nbr	31	ND	17	25	ND	13	3	ND	1
	Mean $\pm$ SD	17368 $\pm$ 10676		11153* $\pm$ 3053	7125 $\pm$ 2231		7083 $\pm$ 5201	800 $\pm$ 500		2900
TIMP-1	Nbr	32	ND	33	26	ND	26	5	ND	9
	Mean $\pm$ SD	109470 $\pm$ 134570		125990 $\pm$ 78660	58520 $\pm$ 39800		102200* $\pm$ 77360	700 $\pm$ 300		700 $\pm$ 500
MCP-1	Nbr	32	ND	33	26	ND	26	5	ND	11
	Mean $\pm$ SD	717 $\pm$ 1055		896 $\pm$ 1139	1391 $\pm$ 1496		2655 $\pm$ 5060	4 $\pm$ 4		29* $\pm$ 24

For each patient, cytokine values were averages of duplicate or triplicate measures. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD) of cytokine values of groups of patients. Nbr : number of patients tested. Normal cytokine values in serum were, respectively: IL-11, 0-5 pg/ml; IL-8, 0-20 pg/ml; IL-6, 0-12 pg/ml; SCF, 550-1440 pg/ml; HGF, 663-1283 pg/ml; TIMP-1, 259000-661000 pg/ml; MCP-1, 109-139 pg/ml; leptin (men), 2200 -7800 pg/ml. Normal BM plasma values were not defined and SE values were used as controls. Because only 3 SE patients were female, PV and SE leptin levels were compared only for men. Serum leptin levels of female PV patients (22061 $\pm$ 15321 pg/ml) tended to be higher than to those of healthy females (10000 $\pm$ 7300 pg/ml) but differences were not significant. (*) p < 0.05 compared to SE; (**) p < 0.05 compared to healthy donors, Mann-Whitney U rank sum test. ND: not done.

Table 2: Analysis of cytokine expression in erythroid cell lines depending on JAK2 status.

	mRNA levels (copies/1000 RPLP0 copies)						
	UKE-1	HEL	UT-7	TF-1	K562	PV GPA+ erythroblasts	SE GPA+ erythroblasts
JAK2	1007 ± 0	14251 ± 6303	20054 ± 6422	3461 ± 219	24254 ± 220	41 ± 19	62 ± 21
HGF	23 ± 0	2861 ± 308	111 ± 35	320 ± 3	13 ± 0	151 ± 66	19 ± 15
IL-11	10 ± 0	615 ± 60	0.7 ± 0	84 ± 18	640 ± 32	107 ± 85	16 ± 20
IL-6	21 ± 0	744 ± 254	2 ± 1	209 ± 39	2948 ± 166	172 ± 121	60 ± 63
TIMP-1	1512 ± 1155	32568 ± 4381	666 ± 317	6529 ± 1370	87047 ± 13649	173 ± 131	14 ± 10
c-MET	0	585 ± 164	7 ± 4	0	441 ± 37	383 ± 442	327 ± 338
gp130	156 ± 39	154 ± 18	57 ± 15	186 ± 1	1165 ± 34	90 ± 49	36 ± 27
STAT3	457 ± 70	1513 ± 996	179 ± 60	3303 ± 54	30651 ± 826	538 ± 310	78 ± 45
STAT5	76 ± 13	572 ± 99	2 ± 1	846 ± 91	138 ± 2	2470 ± 3014	1061 ± 1211
JAK2 status	100% V617F	100% V617F	wild type	wild type	wild type	60% V617F (Mean %)	wild type
Cytokine dependence	no	no	EPO	GM-CSF	no (Bcr-Abl +)		



Boissinot et al. Figure 1

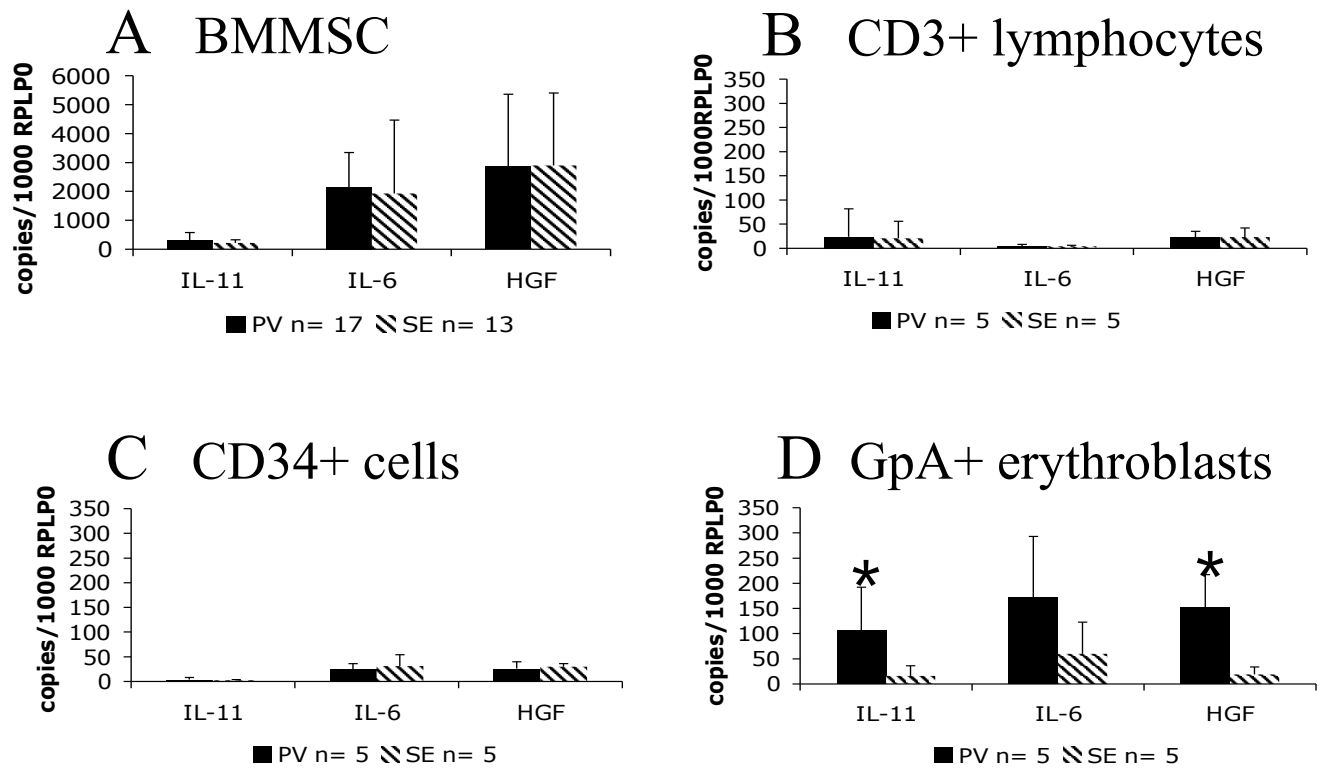


Figure 2

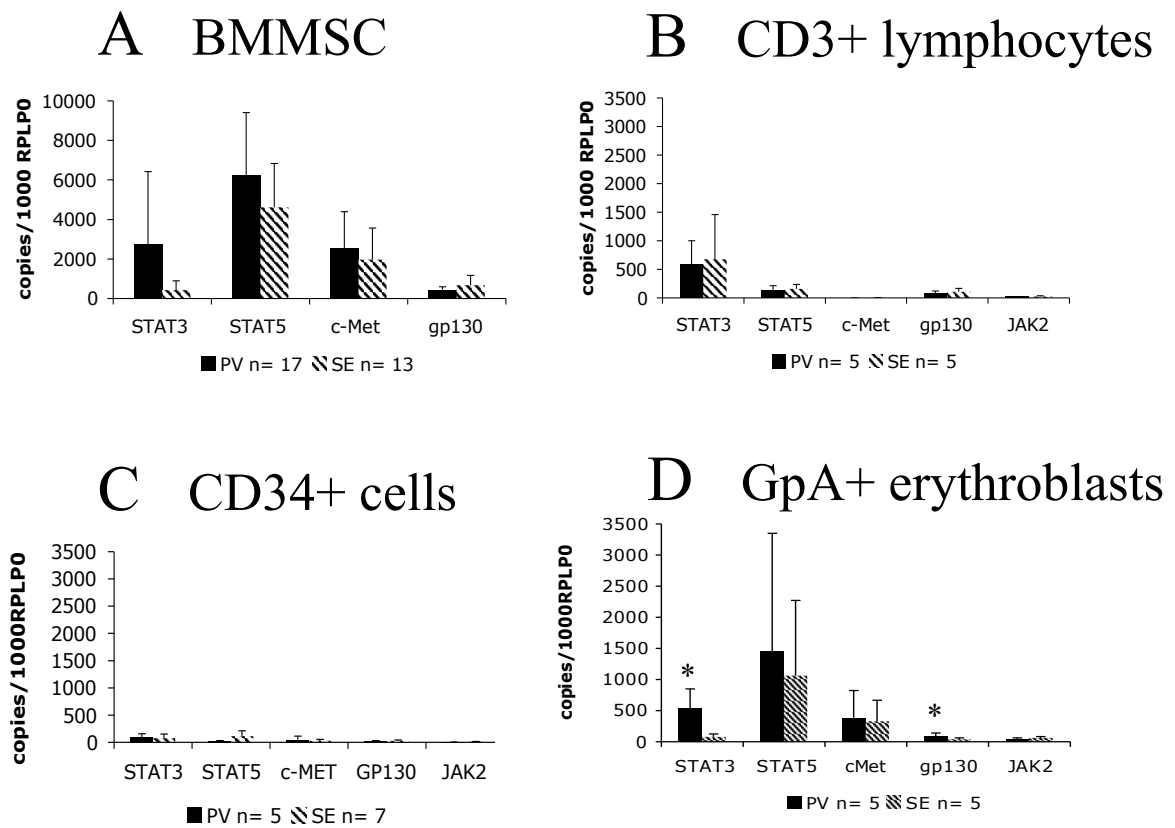
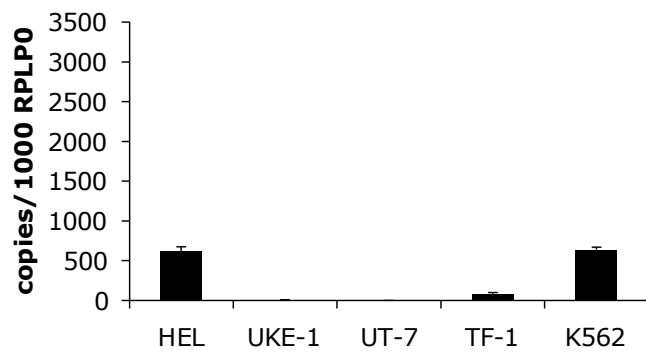
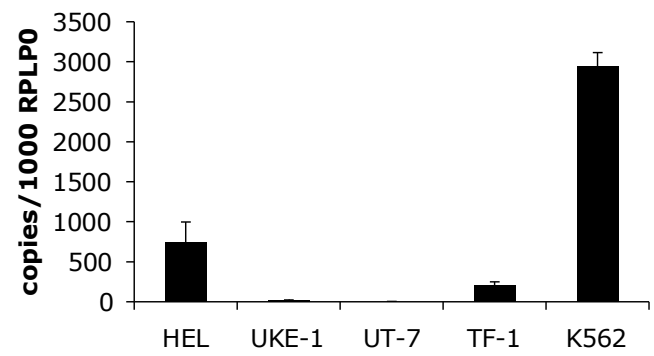


Figure 3

A IL-11



B IL-6



C HGF

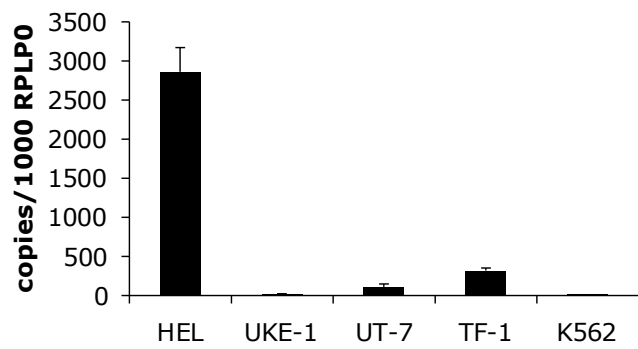


Figure 4 :

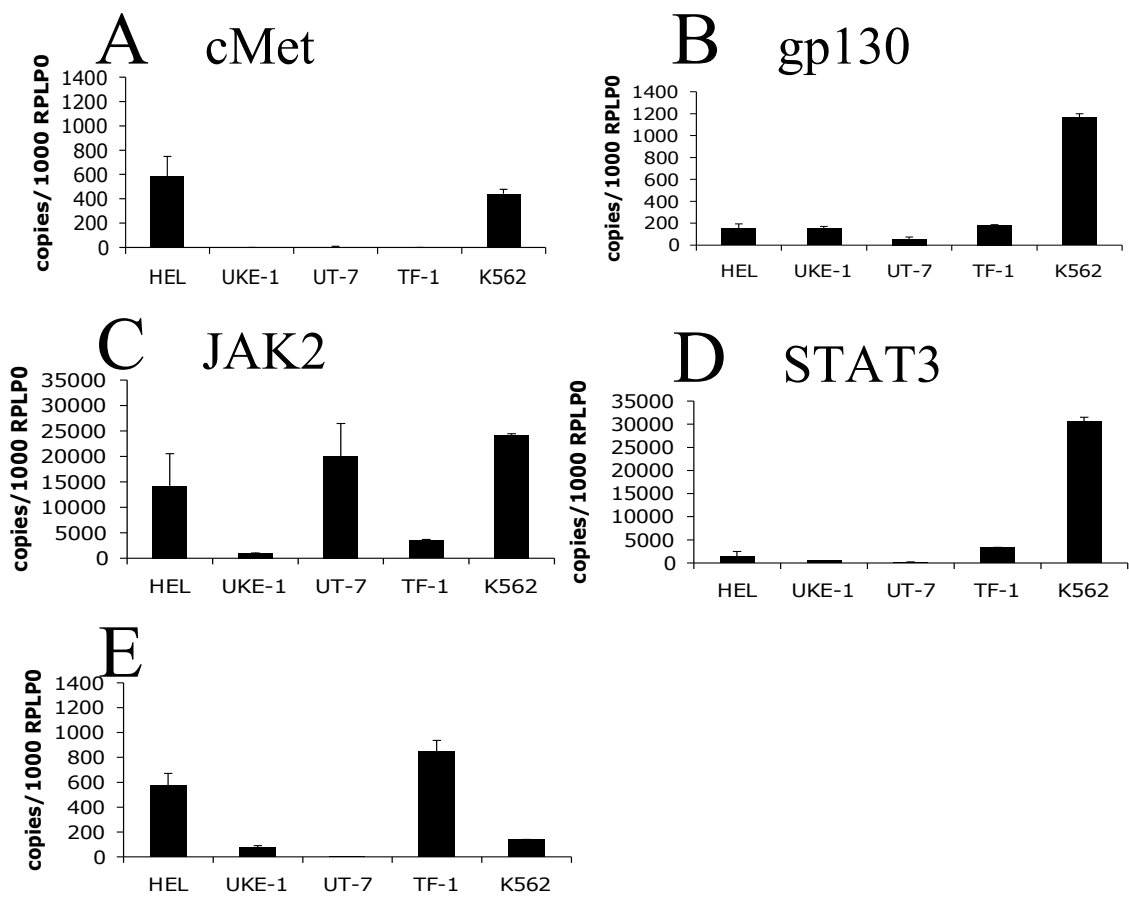


Figure 5

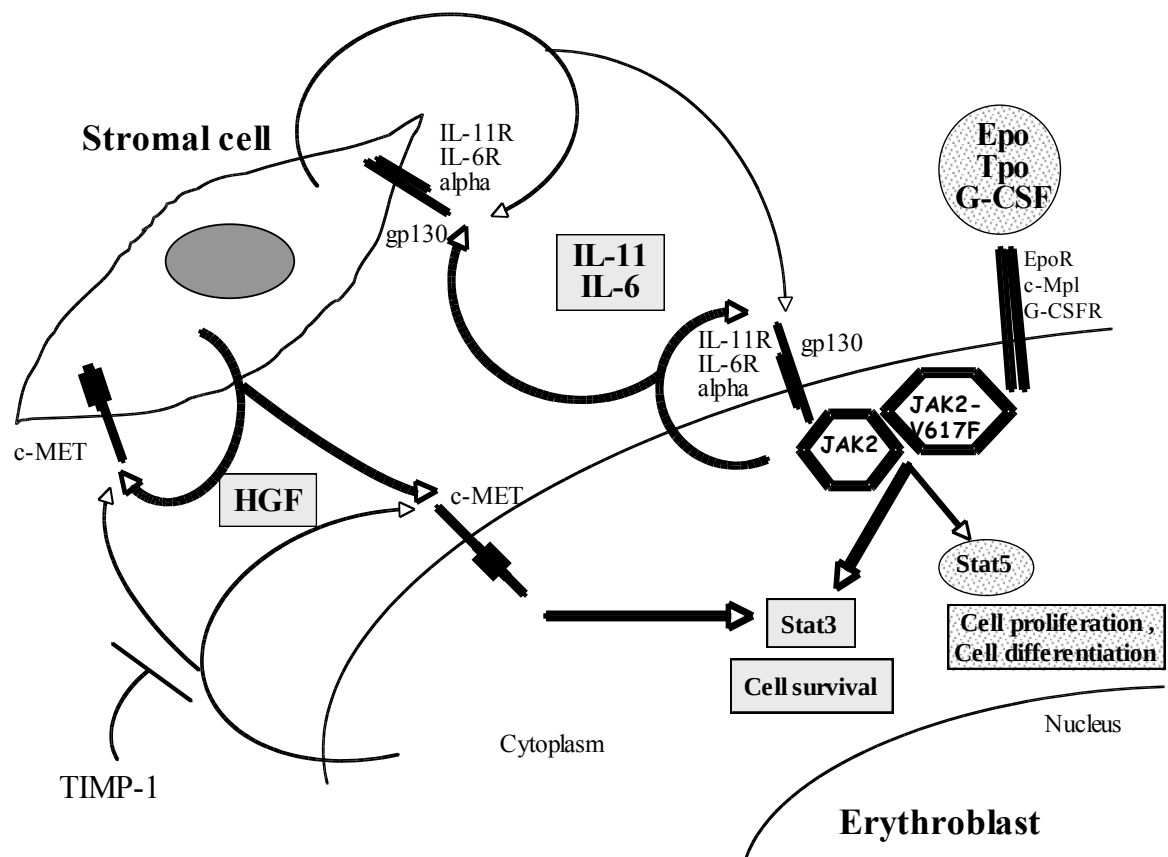


Figure 6

Annex 1: Human Cytokine Antibody Arrays: List of the molecules tested.

POG	POG	NBG	NBG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLD	BMP-4	BMP-6	C-K β S-1	CNTF	BGF	Botulin
POG	POG	NBG	NBG	Blank	Angiogenin	BDNF	BLD	BMP-4	BMP-6	C-K β S-1	CNTF	BGF	Botulin
Botulin-2	Botulin-3	FGF-6	FGF-7	Flt3 Ligand	Fractalkine	GDNF	GDNF	GMP-13F	H309	IFN γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
Botulin-2	Botulin-3	FGF-6	FGF-7	Flt3 Ligand	Fractalkine	GDNF	GDNF	GMP-13F	H309	IFN γ	IGFBP-1	IGFBP-2	IGFBP-4
IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1s	IL-1 β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
IGF-I	IL-10	IL-13	IL-15	IL-16	IL-1s	IL-1 β	IL-1ra	IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7
LepIn	LIGHT	MC P-1	MC P-2	MC P-3	MC P-4	MG-CSF	MDC	MG	MIP-1 α	MIP-3 α	NAP-2	NT-3	PARC
LepIn	LIGHT	MC P-1	MC P-2	MC P-3	MC P-4	MG-CSF	MDC	MG	MIP-1 α	MIP-3 α	NAP-2	NT-3	PARC
PDGF-BB	RANTES	SCF	SDP-1	TARC	TGF- β 1	TGF- β 3	TNF α	TNF β	Blank	Blank	Blank	Blank	POG
PDGF-BB	RANTES	SCF	SDP-1	TARC	TGF- β 1	TGF- β 3	TNF α	TNF β	Blank	Blank	Blank	Blank	POG

POG	POG	NBG	NBG	Blank	Acip30	AgRP	Angiopoietin-2	Amphiregulin	Axl	bFGF	b-NGF	BTG	CCl-28
POG	POG	NBG	NBG	Blank	Acip30	AgRP	Angiopoietin-2	Amphiregulin	Axl	bFGF	b-NGF	BTG	CCl-28
CTAC K	Dk	BSF-R	EMA-78	Fas/TNFRSF6	FGF-4	FGF-9	GCSF	GTR-Ugand	GTR	GR0	GR0- α	HCC-4	HGF
CTAC K	Dk	BSF-R	EMA-78	Fas/TNFRSF6	FGF-4	FGF-9	GCSF	GTR-Ugand	GTR	GR0	GR0- α	HCC-4	HGF
ICAM-1	ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF1 SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 R1	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 R α	IL6 R	IL8
ICAM-1	ICAM-3	IGFBP-3	IGFBP-6	IGF1 SR	IL-1 R4/ST2	IL-1 R1	IL-11	IL-12 p40	IL-12 p70	IL-17	IL-2 R α	IL6 R	IL8
HTAC	Lympholactin	MIF	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-3 β	MSP- α	NT-4	Osteoprotegerin	Oncostatin	M-PIGF	spp13D	sTNF RII	sTNF-R I
HTAC	Lympholactin	MIF	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-3 β	MSP- α	NT-4	Osteoprotegerin	Oncostatin	M-PIGF	spp13D	sTNF RII	sTNF-R I
TECK	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	TRAIL R3	TRAIL R4	UPAR	VEGF	VEGF-D	Blank	Blank	Blank	Blank	POG
TECK	TIMP-1	TIMP-2	Thrombopoietin	TRAIL R3	TRAIL R4	UPAR	VEGF	VEGF-D	Blank	Blank	Blank	Blank	POG

Annex 2: Primers and probes used for cytokine RT-qPCRs.

IL-11: Amplicon: 99 bp

Forward primer	5'-AACTGTGTTTGCCGCCTGGT-3'
Reverse primer	5'-GGTCTGGGGAAACTCGAGGG-3'
Probe	5'-TGAGCCTGTGGCCAGATACA-3'

IL-6: Amplicon: 124 bp

Forward prime	r	5'-CCAGTACCCCCAGGAGAAGATTCC-3'
Reverse primer		5'-CCTTTCTCAGGGCTGAGATGCC-3'
Probe		5'-CAGACAGCCACTCACCTCTCAG-3'

HGF: Amplicon: 93 bp

Forward primer	5'-CCGTCCAGCAGCACCATGT-3'
Reverse primer	5'-GATGGCGATGGGGAGCAG-3'
Probe	5'-ACCAAACCTCTGCCAGCCC-3'

TIMP-1 : Amplicon 126 bp

Forward primer	5' CCA-CAG-ACG-GCC-TTC-TGC-AAT-T 3'
Reverse primer	5' AAC-CGG-ATG-TCA-GCG-GCA-TC 3'
Probe	5' CCT-CGT-CAT-CAG-GGC-CAA-GTT-C 3'

β-actin: Amplicon: 128 bp

Forward primer	5'-GATGCAGAACGAGATCACTGCCCC-3'
Reverse primer	5'-TCTGCTGGAAGGTGGACAGC-3'
Probe	5'-AAGATCAAGGTCATTGCTCCTCCT-3'

RPLP0 : Amplicon 102 bp

Forward primer	5'-GTGATGTGCAGCTGATCAAGACTGG-3'
Reverse primer	5'-GGACACCAGCCCAAAGGAGA-3'
Probe	5'-GACAAAGTGGGAGCCAGCG-3'

cMet : Amplicon 125 bp

Forward primer	5'- CCAGCTTGCTAGACAAATAGGAGCCA-3'
Reverse primer	5'- GATAGGGAATGCACACATGGCAGATC-3'
Probe	5'- TTT CGGGGTGTTTCGCACAAAGC-3'

STAT5 : Amplicon 130 bp common to alpha and beta forms

Forward primer	5'- AGAAGCACCAGAAGACCCTGCA-3'
Reverse primer	5'- CAGGACTGTAGCACGTCCAGG-3'
Probe	5'- CGAGCTGATCCAGTGGAAGCG-3'

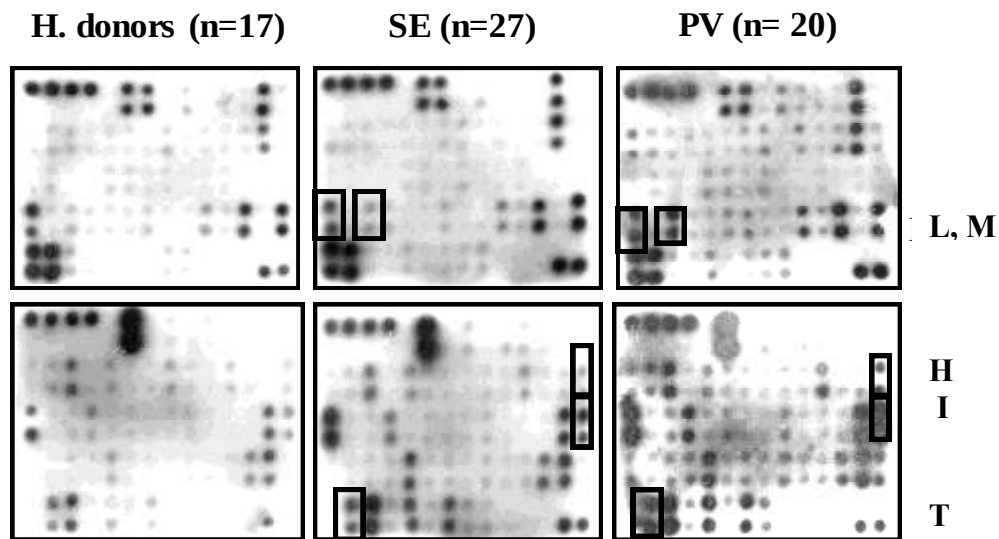
STAT3 : Amplicon 128 bp common to alpha and beta forms

Forward primer	5'- CTTTTTTACCAAGCCCCCAATTGGAACC-3'
Reverse primer	5'- ACCCTGAATAATTCACACCAGGTCCC-3'
Probe	5'- TGAGCTGGCAGTTCTCCTCCA C-3'

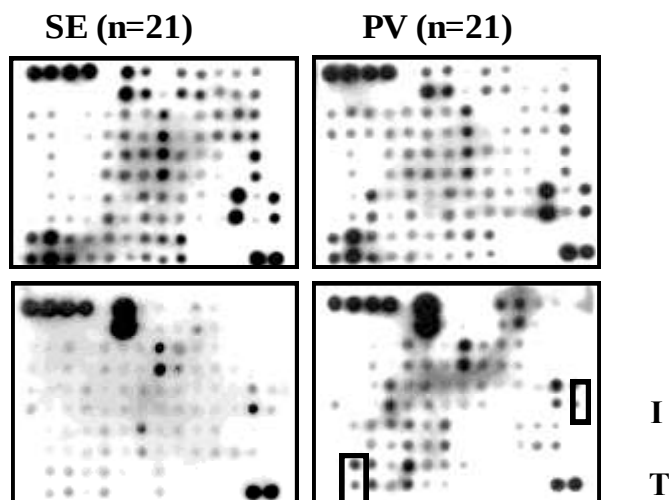
gp 130 : Amplicon 102 bp common to variant forms

Forward primer	5'-GGGAAGAAAATGAGG TGTGAGTGGGAT-3'
Reverse primer	5'-GGCAACACACAAGTTTGCTGATTGCAAA-3'
Probe	5'-GGAAGGGAAACACACTTGGAGACAAACT-3'

SERUM



BONE MARROW PLASMA



Supplementary Figure 1: Analysis of cytokines present in pools of serum and BM plasma of SE and PV patients using cytokine arrays. Human Cytokine Array VI and VII (Raybiotech, Inc.) containing each 60 cytokines and growth factors (See list in Annex 1) were used, following the manufacturer's instructions, to screen pools of serum from healthy donors, SE and PV patients, as well as pools of BM plasma from SE and PV patients. Molecules giving a stronger signal - over-expressed - in SE compared to healthy donors, or in PV compared to SE, are encircled and indicated on right side of blots by the first letter of their name. H. donors: healthy donors; L: leptin ; M: MCP-1 ; H: HGF ; I: IL-8 ; T: TIMP-1.

Suppl Table 1: Correlations between mRNA levels of cytokines and signaling molecules.

mRNA levels (copies/1000 RPLP0 copies)		
Cell Type	PV	SE
BMMSC	IL-6/ HGF n= 16 r= 0,54 p=0,03*	IL-6/HGF n= 11 r= 0,11 p=0,73
CD34+ cells	HGF/TIMP-1 n= 5 r= 0,7 p= 0,23	HGF/TIMP-1 n=5 r= 1 p= 0,017*
	STAT3/ IL-6 n=4 r= 1 p= 0,08	STAT3/IL-6 n= 5 r= -0,13 p= 0,78
	STAT3/gp130 n= 4 r= 0,95 p= 0,08	STAT3/gp130 n= 5 r= 0,87 p= 0,08
	STAT3/Total JAK2 n= 4 r= -0,2 p= 0,9	STAT3/Total JAK2 n= 5 r= 0,87 p= 0,08
	STAT5/gp130 G697C n= 5 r= -0,61 p= 0,35	STAT5/gp130 G697C n= 7 r= 0,94 p= 0,007**
	cMet/IL-6 n= 5 r= 0,9 p= 0,08	c-Met/IL-6 n= 6 r= 0,37 p= 0,49
	c-Met/gp130 n= 5 r= 0,87 p= 0,08	c-Met/gp130 n= 7 r= 0,53 p= 0,24
GPA+ erythroblasts	IL-11/IL-6 n= 5 r= 1 p= 0,017	IL-11/IL-6 n= 5 r= 1 p= 0,017
	IL-11/HGF n= 5 r= 1 p= 0,017	IL-11/HGF n= 5 r= 1 p= 0,017
	IL-6/HGF n= 5 r= 1 p= 0,017	IL-6/HGF n= 5 r= 1 p= 0,017
	STAT5/c-Met n= 5 r= 0,9 p= 0,08	STAT5/cMet n= 5 r= 1 p= 0,017*
	IL-11/STAT5 n= 5 r= 0,9 p= 0,08	IL-11/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0,017*
	IL-6/STAT5 n= 6 r= 0,88 p= 0,03*	IL-6/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0,017*
	HGF/STAT5 n= 6 r= 0,94 p= 0,017*	HGF/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0,017*
	gp130/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0,017*	gp130/STAT5 n= 5 r= 1 p= 0,017*
	Total JAK2/STAT5 n= 5 r= - 0,98 p= 0,0028**	Total JAK2/STAT5 n=5 r= 0,6 p= 0,35
	IL-11/c-Met n= 5 r= 0,9 p= 0,08	IL-11/c-Met n= 5 r= 1 p= 0,017*
	IL-6/c-Met n= 6 r= 0,9 p= 0,017*	IL-6/c-Met n= 5 r= 1 p= 0,017*
	HGF/c-Met n=6 r= 0,88 p= 0,03*	HGF/c-Met n= 5 r= 1 p= 0,017*
	gp130/c-Met n= 5 r= 1 p= 0,017*	gp130/c-Met n= 5 r= 1 p= 0,017*
	Total JAK2/c-Met	Total JAK2/c-Met

ii. Conclusion et commentaires

Dans cette étude, Nous avons tout d'abord mis en évidence une augmentation de la production d'IL-6, d'HGF et de TIMP-1, une molécule impliquée dans la régulation de l'activité d'HGF. Nous avons également confirmé l'augmentation du taux d'IL-11 dans le sérum et le plasma médullaire des patients atteints de PV.

De plus, nous avons observé une dérégulation de l'expression au niveau de l'ARN messager d'IL-11, et d'HGF, de leurs récepteurs (c-Met et gp130) et de STAT3 (molécule de signalisation commune aux voies HGF/cMet et IL-11/gp130) dans les érythroblastes GpA+ de patients atteints de PV comparés aux contrôles PS. Nous avons également mis en évidence des corrélations entre les molécules activant STAT3 (IL-11, IL-6, HGF, cMet) et STAT5, ce qui indique l'existence d'une coopération entre les deux voies de signalisation dans les érythroblastes.

Par ailleurs, nous avons observé des taux d'ARN messager d'IL-11, IL-6, d'HGF et de STAT5 supérieurs dans les précurseurs granulocytaires de patients atteints de PV (données non présentées dans l'article). Ces résultats confirment l'existence d'une dérégulation de la production de ces trois cytokines dans les cellules de la lignée myéloïde. Par contre, aucune corrélation entre les taux d'ARN messager des différentes cytokines et molécules de signalisation n'a été observée dans les précurseurs granulocytaires. Ce dernier résultat semble indiquer que la dérégulation du mécanisme de coopération entre les voies STAT3 et STAT5 est spécifique des érythroblastes de patients atteints de PV.

Nous avons démontré l'existence de corrélations entre les taux de cytokines et le taux de JAK2 total mais pas avec le taux de JAK2V617F indiquant que la dérégulation de leur production serait indépendante de cette mutation. Ces résultats sont complétés par l'étude similaire conduite sur les lignées érythroïdes, en effet, aucune corrélation n'a été observée entre le profil cytokinique et le statut JAK2 des lignées (WT ou homozygote V617F). Néanmoins, ces résultats ne sont pas une démonstration formelle de l'indépendance vis-à-vis de JAK2V617F. des expériences de transfections avec JAK2V617F sont en cours. Elles devraient permettre de déterminer l'impact de la surexpression de JAK2 et de la mutation JAK2V617F sur le profil d'expression cytokinique et sur l'expression des récepteurs à la surface des cellules

DISCUSSION

I. La mutation JAK2V617F dans les syndromes myéloprolifératifs.

Fréquence et impact de la mutation JAK2V617F dans les SMP.

Les syndromes myéloprolifératifs représentent un groupe de maladies hétérogènes caractérisées par l'augmentation de la prolifération d'une lignée myéloïde. L'origine clonale de l'hématopoïèse est l'un des phénomènes clés des SMP. Le clone malin peut toucher à la fois la lignée myéloïde, et la lignée lymphoïde (Ishii, Bruno et al. 2006; Li, Kralovics et al. 2008). La PV et la MFP présentent toujours une hématopoïèse clonale, cependant certains cas de TE ont été montrés comme développant une hématopoïèse polyclonale (Harrison, Gale et al. 1999; Liu, Jelinek et al. 2003).

La mutation JAK2V617F a été décrite en 2005 par le groupe du Dr William Vainchenker (James, Ugo et al. 2005), et confirmée par plusieurs groupes dans le monde la même année (Baxter, Scott et al.; James, Ugo et al. 2005; Kralovics, Passamonti et al. 2005; Levine, Wadleigh et al. 2005). La mutation est présente dans plus de 95% des PV, et 50% des MFP à la fois à l'état homozygote et hétérozygote. Il a été mis en évidence que l'état homozygote des PV et des MFP était dû à une perte d'hétérozygotie au niveau du bras court du chromosome 9p (9pLOH) et que ce phénomène est la conséquence d'une recombinaison homologue (Kralovics, Guan et al. 2002). La mutation JAK2V617F est également présente dans 50% des TE mais uniquement à l'état hétérozygote. La découverte de JAK2V617F constitue un point important dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les SMP. Les études concernant la fréquence et la quantification du pourcentage de cellules mutées ont permis de mettre en évidence plusieurs points critiques. La mutation est détectée dans les PV, les TE et les MFP, mais jamais dans les formes réactionnelles, ni chez les sujets sains. JAK2V617F est donc spécifique des SMP. Cependant comme nous avons pu le décrire dans l'étude de l'article 1 (Lippert, Boissinot et al. 2006), la présence et le niveau d'expression de la mutation JAK2V617F n'expliquent pas le phénotype du SMP. Ces résultats ont été confirmés par la suite (Moliterno, Williams et al. 2006). De plus, il a été récemment mis en évidence que l'absence de la mutation JAK2V617F dans la PV ne permet pas d'en exclure le diagnostic. En effet, une étude a révélé qu'environ la moitié des patients

atteints de PV négatifs pour JAK2V617F étaient positifs pour des mutations de l'exon 12 de JAK2, décrites en 2007 (Scott, Tong et al. 2007; Spivak 2007). Par ailleurs, des études de clonalité, ont été réalisées chez des patientes atteintes de PV : inactivation du chromosome X (marqueur MPP1). Ces études ont mis en évidence que chez la majorité des patients, seule une proportion du clone SMP est porteuse des mutations de JAK2. Cette proportion est variable selon les patients (Kralovics, Teo et al. 2006; Nussenzveig, Swierczek et al. 2007). Enfin, l'une de ces études a également mis en évidence la présence de BFU-E endogènes non porteuses de la mutation JAK2V617F dans les cultures en absence d'Epo. Concernant les études sur les modèles d'animaux transgéniques porteurs de la mutation JAK2V617F, il a été mis en évidence que l'intégration de plus de 10 copies de JAK2V617F est nécessaire pour observer une élévation de l'hématocrite (Tiedt, Hao-Shen et al. 2008; Xing, Wanting et al. 2008). De plus, les animaux présentent un phénotype PV qui n'est que transitoire et évolue ensuite vers une myélofibrose (Lacout, Pisani et al. 2006; Wernig, Mercher et al. 2006). Cette évolution n'est pas fréquente chez les patients. La mutation JAK2V617F, seule, ne permet donc pas d'induire le phénotype de PV complet. Ainsi, l'ensemble de ces éléments est en faveur de l'apparition précoce (présence au diagnostic), mais secondaire, des mutations de JAK2 dans la pathogénèse des SMP. Les mutations de JAK2 ne sont pas responsables de la clonalité. Par contre, elles sont responsables de symptomatologie clinico-biologique des SMP. En effet, l'hétérozygotie est associée à un taux de plaquettes élevé (TE), alors que l'homozygotie est associée à une élévation de l'hématocrite (PV).

En ce qui concerne l'influence de JAK2V617F sur le pronostic des SMP, les résultats sont encore controversés. Par exemple, dans le cas de la MFP, deux études ont conduit à des résultats distincts sur l'implication de JAK2V617F dans la survie des patients (Tefferi, Lasho et al. 2005; Campbell, Griesshammer et al. 2006). De manière similaire, dans la PV, la présence de JAK2V617F ne semble pas associée à un risque supérieur de complications (incluant les thromboses). Des résultats similaires ont été observés dans la TE. (Tefferi, Lasho et al. 2006; Vannucchi, Antonioli et al. 2007).

Dans une étude parue très récemment (Plo, Nakatake et al. 2008), il a été décrit que la mutation JAK2V617F serait impliquée dans la dérégulation de la recombinaison homologue dans les SMP. En effet, cette étude a mis en évidence que des cellules BaF3 exprimant l'EpoR et la mutation JAK2V617F présentaient une augmentation de 50% de la recombinaison homologue par rapport aux cellules non porteuses de la mutation. Enfin, ils ont démontré la présence de l'augmentation de la recombinaison homologue dans les progéniteurs CD34+ de patients atteints de PV et de MFP. Cependant, chez l'homme, le passage de l'état

JAK2V617F hétérozygote à l'état homozygote n'est pas fréquent puisque les TE se transforment rarement en PV. Les résultats de cette étude sont en faveur de l'apparition secondaire de JAK2V617F. En effet, il semblerait que d'autres événements participent à la recombinaison homologue, soit de manière positive dans les cas de PV et de MFP, soit de manière inhibitrice dans les cas de TE.

La mutation JAK2V617F dans le diagnostic de formes latentes ou masquées de SMP.

La détection de JAK2V617F constitue un outil indispensable à l'établissement du diagnostic des SMP dans leur présentation classique. Cependant, nous avons également mis en évidence que l'évaluation de la présence de JAK2V617F est nécessaire dans le diagnostic de formes latentes de SMP et dans des présentations atypiques comme les thromboses digestives profondes et les anémies réfractaires sidéroblastiques avec thrombose (ARS-T) (articles 2 et 3).

Nos résultats ont été corroborés par plusieurs études. En 2006, une étude réalisée sur une cohorte de 270 patients dont 35 syndromes myélodysplasiques a mis en évidence la présence de JAK2V617F dans 6 patients parmi les 35. Ces six patients étant atteints d'ARS-T (Szpurka, Tiu et al. 2006). Plus récemment en 2008, un autre groupe a décrit la présence de la mutation JAK2V617F dans 48% des ARS-T (11/23 patients) (Schmitt-Graeff, Teo et al. 2008). Leurs résultats montrent une association entre la présence de la mutation et un nombre d'érythrocytes et de lymphocytes supérieur ainsi qu'un volume globulaire moyen inférieur par rapport aux patients non porteurs de JAK2V617F. Certains patients de leur cohorte sont homozygotes (6/11 patients) pour JAK2V617F, la perte d'hétérozygotie s'accompagnant d'une élévation du taux de plaquettes.

Cette dernière observation montre que la TE secondaire à une ARS-T diffère de la TE classique non seulement par l'absence de formation de colonies endogènes comme nous l'avons mis en évidence, mais aussi par la présence de patients homozygotes pour JAK2V617F.

Enfin, concernant la question de la concomitance de JAK2V617F avec un phénotype anémique, on peut penser que les mécanismes, encore non déterminés, à l'origine de la dysérythropoïèse et de l'apoptose accrue contrecarrent les effets prolifératifs de JAK2V617F.

Cependant, il a été observé que le nombre d'érythrocytes est supérieur, et le volume globulaire moyen inférieur en l'absence de carence martiale. Dans ce cas, JAK2V617F semble pouvoir exercer son effet prolifératif. Il est aussi à noter plusieurs cas de patients atteints de thalassémie ou de drépanocytose et porteurs de la mutation JAK2V617F (données non publiées).

Des études ont également été réalisées dans les cas de thromboses, digestives ou non. Une première étude en 2006 (Patel, Lea et al. 2006), mesure un pourcentage de JAK2V617F dans 58,5% de syndrome de Budd-Chiari (SBC) (21/41 patients). Ce pourcentage concorde avec les résultats de notre étude (article 3). Cette étude montre également que les patients atteints de SBC et porteurs de la mutation JAK2V617F présentent un hémocrite, et un taux d'hémoglobine supérieurs à ceux des patients non porteurs de la mutation. Après suivi, 11 patients sur 41 ont développé un SMP (9 TE et 3 PV). En 2008, une autre étude a été réalisée chez des patients atteints de SBC (n= 104) ou de thrombose porte splanchnique (TPS) (n= 137) (Kiladjian, Cervantes et al. 2008). Ici encore, les pourcentages de JAK2V617F sont proches de ceux de notre étude : 45% dans les SBC et 34% dans les TPS. Ils ont également observé que les patients atteints de SBC porteurs de la mutation présentent une forme plus sévère de la maladie que les patients négatifs pour JAK2V617F.

En 2007, une étude de détection de JAK2V617F chez des patients souffrant de thromboses non digestives a été réalisée (Pardanani, Lasho et al. 2007). Les patients présentaient des sites de thromboses au niveau du cerveau, de la rétine et des poumons principalement. Sur les 210 patients testés par AS-qPCR, 4 seulement (2%) se sont révélés porteurs de la mutation, avec une médiane d'expression allant de 2,2 à 5,3%. Les quatre patients présentaient tous des épisodes récurrents de thromboembolisme veineux idiopathique, ils ne possédaient aucun des critères classiques de diagnostic de SMP.

Fréquence de la mutation JAK2V617F dans les cas de leucémies aigues myéloïdes *de novo* et post-SMP.

Les leucémies aigues myéloïdes (LAM) constituent l'une des possibles complications des SMP (<10%). Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés à la question du rôle éventuel de JAK2V617F dans la transformation des SMP en LAM, ainsi que sur la présence de la mutation dans les LAM *de novo*. De manière générale, il a été mis en évidence que JAK2V617F représente un évènement rare dans les cas de LAM *de novo* (3% à 9% selon les études) (Vicente, Vazquez et al. 2007). Cependant dans les cas de LAM secondaires à un

SMP, la fréquence de JAK2V617F est plus importante (3/4 patients (Levine, Loriaux et al. 2005) ; 5/14 patients (Jelinek, Oki et al. 2005)).

L'étude que nous avons réalisé, en collaboration avec l'équipe du Dr Skoda, a permis de mettre en évidence que dans la majorité des cas un SMP positif pour JAK2V617F se transforme en LAM négative pour cette mutation. En effet, même si la mutation JAK2V617F est amplifiée par PCR dans les échantillons de cellules non purifiées de patients atteints de LAM, dans la majeure partie des cas, après purification des blastes leucémiques, on ne détecte plus la mutation. Les résultats des analyses de clonalité sont en faveur de l'existence d'un ancêtre commun aux clones SMP et LAM. Ces résultats ont d'ailleurs été corroborés par une autre étude réalisée elle aussi en 2006 (Pasqualucci, Li et al. 2008). Cette étude évoque le cas d'un patient ayant développé une LAM positive pour la mutation NMP1 suite à une MFP positive pour JAK2V617F. Les blastes leucémiques n'étaient pas porteurs de la mutation JAK2V617F et une étude d'inactivation du chromosome X a mis en évidence que c'est le même chromosome X qui est inactivé dans le clone SMP et le clone LAM. Ces résultats sont donc en faveur d'un ancêtre commun entre les deux clones. Ici encore la présence d'un ancêtre commun aux clone SMP et LAM, non porteur de la mutation JAK2V617F, est en faveur de la survenue secondaire de cette mutation dans la pathogénèse des SMP.

Par ailleurs, la mutation JAK2V617F a été détectée dans quelques cas de leucémie myélomonocytaire chronique et de leucémie myéloïde chronique atypique (9/116 patients) mais jamais dans les leucémies aiguës lymphoïdes (T et B) (Jelinek, Oki et al. 2005).

Nous avons également mis en évidence que le délai de transformation était plus long chez les patients porteurs de JAK2V617F par rapport aux patients non mutés. Ce résultat est en faveur d'un effet protecteur de la mutation JAK2V617F (effet différenciateur) vis-à-vis de la transformation en LAM (effet prolifératif). Cependant, une autre étude, réalisée en 2007, (Vicente, Vazquez et al. 2007) a analysé 339 patients atteints de LAM et n'a pas mis en évidence de différence entre les patients positifs et négatifs pour JAK2V617F, en terme de survie globale et de pronostic sur la LAM.

Enfin, une étude récente, réalisée chez des patients atteints de leucémies aiguës lymphoïdes T (LAL-T) et B (LAL-B), a mis en évidence la présence de mutations de la tyrosine kinase JAK1 (Flex, Petrangeli et al. 2008). Cette étude a mis en évidence des mutations de JAK1 au niveau des domaines FERM, SH2, pseudokinase et kinase. Ces mutations sont plus fréquentes chez les patients atteints de LAL-T (18% des cas contre 3% des LAL-B). Ils ont également montré que ces mutations sont acquises, et apparaissent

secondairement au déclenchement de la pathologie, comme c'est le cas pour les mutations de JAK2 dans les SMP.

Ainsi, il semble que la survenue de mutations activatrices des kinases JAK, a priori secondaires, est un phénomène relativement fréquent dans les pathologies hématologiques malignes.

II. Dérégulation de cytokines dans la PV, lien avec JAK2V617F et implications dans la pathogénèse de la maladie.

Cytokines et pousse endogène de colonies à partir de progéniteurs de patients atteints de SMP

La pousse endogène de colonies érythroïdes et mégacaryocytaires en absence de sérum et de cytokines exogènes est caractéristique de la PV et de la TE respectivement. Plusieurs études antérieures ont mis en évidence que les progéniteurs de patients atteints de PV et de TE restent hypersensibles aux cytokines telles que l'Epo, l'IL-3 et le SCF (Kobayashi, Teramura et al. 1993; Dai, Krantz et al. 1994; Wickrema, Chen et al. 1999). Les colonies endogènes sont majoritairement porteuses de la mutation JAK2V617F. Cependant, il a été démontré que certaines de ces colonies ne portent aucune mutation des exons 12 ou 14 de JAK2 (Li, Kralovics et al. 2008). Ces résultats mettent en évidence le caractère hétérogène du clone SMP. De plus, il est également observé qu'*in vitro* en présence de cytokines, les colonies porteuses de la mutation disparaissent au profit de colonies non mutées (Ishii, Bruno et al. 2006; Gaikwad, Nussenzveig et al. 2007). Ceci indique qu'une compétition persiste entre les cellules porteuses et non porteuses de JAK2V617F.

L'étude réalisée par *Wickrema et al.* en 1999 a permis de montrer une diminution de l'expression de la tyrosine phosphatase SHP-1 dans les progéniteurs érythroïdes de PV. SHP-1 est impliquée dans le rétrocontrôle de la signalisation en aval des récepteurs de l'Epo, de l'IL-3 et du SCF ; une diminution de son expression a donc pour conséquence la prolongation du signal induit par les cytokines. Dans le cas de la PV, cette anomalie d'expression de SHP-1 semble participer à la pathogénèse de la PV. De plus, cette même étude a démontré que s'il n'existe aucune différence entre les CFU-E PV et les CFU-E saines dans les stades de maturation précoces, il existe une différence dans les stades tardifs. En effet, les CFU-E issues

de patients atteints de PV présentent un retard de maturation au niveau des étapes les plus tardives comparé aux CFU-E saines.

Notre étude a permis de mettre en évidence qu'en plus des cytokines précédemment citées, les progéniteurs de patients atteints de PV sont également hypersensibles à l'IL-11 et à l'IL-8, deux cytokines dont la production est augmentée dans la PV par les cellules stromales de moelle osseuse et par les progéniteurs érythroïdes des patients (Hermouet, Godard et al. 2002). L'IL-11 et l'IL-8 peuvent donc agir de façon autocrine/paracrine sur les progéniteurs des patients atteints de PV. Nous avons également montré que l'ajout d'anticorps dirigés contre ces cytokines ou leurs récepteurs inhibe la pousse endogène de colonies. Ces éléments indiquent que les progéniteurs sont non seulement hypersensibles, mais également dépendants vis-à-vis de la signalisation induite par l'IL-11 et l'IL-8.

L'IL-8 est produite par de nombreux types cellulaires dont les cellules stromales de la moelle osseuse et les progéniteurs CD34+. Elle joue un rôle dans l'hématopoïèse précoce par stimulation directe de la prolifération des progéniteurs CD34+. Il semblerait également que l'IL-8 puisse agir de manière autocrine/paracrine sur les progéniteurs CD34+, ceux-ci exprimant de faibles quantités du récepteur CXCR2 (Corre, Pineau et al. 1999)

L'IL-11 joue un rôle dans l'hématopoïèse en synergie avec différents facteurs. En association avec le SCF, elle favorise la différenciation des progéniteurs multipotents vers la voie érythroïde, alors qu'en synergie avec l'Epo, l'IL-11 stimule la prolifération des cellules érythroïdes différenciées. L'IL-11 est également produite par les cellules du microenvironnement médullaire sur lesquelles elle possède une action autocrine/paracrine. Elle est donc capable, indirectement, de stimuler la prolifération de ces cellules et ainsi de réguler positivement l'hématopoïèse (Du and Williams 1997).

Dans une étude récente (Ishii, Zhao et al. 2007), il a été mis en évidence que le milieu de culture conditionné par les cellules CD3+ (négatifs pour la mutation JAK2V617F), purifiées à partir du sang périphérique (pureté >99% vérifiée par FACS), de patients atteints de PV stimule la pousse de BFU-E et de CFU-Mk par les cellules de sang de cordon et les CD34+ issus du sang de patients atteints de PV. Les cellules CD3+ cultivées de PV dans cette étude produisent de manière constitutive de grandes quantités d'IL-11 ($96,7 \pm 56,8$ pg/ml) et de GM-CSF ($12,4 \pm 10,1$ pg/ml). L'IL-11 n'est pas produite par les lymphocytes CD3+ normaux. Comme il l'a été démontré dans notre étude, ils ont observé que l'ajout d'un anticorps dirigé contre l'IL-11 inhibe la pousse, de BFU-E et de CFU-Mk, stimulée par le milieu conditionné par les lymphocytes CD3+. Par ailleurs, il faut noter que les colonies ainsi formées sont toutes porteuses de la mutation JAK2V617F, contrairement à celles obtenues après stimulation par

l'Epo. Cette étude a donc mis en évidence que les lymphocytes CD3⁺ négatifs pour JAK2V617F sont de forts producteurs d'IL-11, or dans l'étude que nous avons réalisée sur les cytokines liées à JAK2 et dérégulées dans la PV, nos résultats sur les cellules CD3⁺ sont différents. Tout d'abord, les CD3⁺ sont purifiés à partir de moelle osseuse de patients atteints de PV (pureté 98% vérifiée par numération de cytoSpin). Une partie des cellules CD3⁺ de notre étude s'est révélée porteuse de la mutation JAK2V617F (n= 6, 29±21%, médiane 25, de 7 à 67%). D'autres études ont mis en évidence la présence occasionnelle de la mutation JAK2V617F dans les lymphocytes, purifiés à partir de sang périphérique CD3⁺ et CD19⁺ (Ishii, Bruno et al. 2006; Larsen, Christensen et al. 2007; Li, Kralovics et al. 2008). Ensuite, les résultats de nos expériences de RT-qPCR ont montré que les cellules CD3⁺ ne produisent pas d'ARNm pour l'IL-11. Il est donc possible que la présence de la mutation JAK2V617F influe sur le profil de production de cytokines des cellules CD3⁺. La présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules lymphoïdes de certains patients SMP est en faveur de l'apparition de la mutation au niveau d'un progéniteur de potentiel lymphoïde et myéloïde.

L'IL-11 est donc impliquée dans la stimulation de l'hématopoïèse dans la PV. Les cellules stromales de moelle osseuse sont donc la première source de production d'IL-11 identifiée pour le moment.

Cependant, les expériences d'anticorps bloquant ont révélé une inhibition seulement partielle de la pousse endogène. Il est vrai qu'un anticorps bloquant ne peut pas inhiber totalement les boucles autocrines comme celles exercées par l'IL-11 et l'IL-8 au niveau des progéniteurs de patients atteints de PV. Ces résultats suggèrent, cependant, que d'autres cytokines pourraient être impliquées dans les mécanismes de dérégulation de l'hématopoïèse dans la PV.

Dans notre étude, nous n'avons pas observé d'activation constitutive de JAK2, contrairement à ce qui avait été démontré précédemment (James, Ugo et al. 2005). Les activations constitutives de la voie JAK/STAT sont fréquentes dans les cancers et il a été mis en évidence qu'une surexpression des JAKs permet l'évolution vers la transformation en cellule cancéreuse mais que cette anomalie n'est pas suffisante pour transformer une cellule. La surexpression ou l'activation constitutive des JAKs permet une pousse des cellules en absence de cytokines ou du moins en présence de très faibles quantités de celles-ci (hypersensibilité) (Knoops, Hornakova et al. 2008). Dans notre cas, l'absence de détection d'une activation constitutive de JAK2 peut être due à la déprivation des cellules en cytokines 18 heures avant l'expérience.

Enfin, plusieurs études ont mis en évidence le fait que la présence d'un dimère de récepteur de cytokine de type I préformé à la membrane des cellules serait un pré-requis à l'activation complète de JAK2V617F (Constantinescu, Girardot et al. 2008; Lu, Huang et al. 2008).

Ces résultats suggèrent donc la nécessité d'autres événements (hyperproduction de cytokines, dimérisation de récepteurs) pour permettre un contexte favorable à l'expression optimale des effets de la mutation JAK2V617F.

Cytokines et autres molécules liées à JAK2V617F et dérégulées dans la PV

Dans cette étude, nous avons mis en évidence une surexpression au niveau protéique (sérum et plasma médullaire) et ARN messager (cellules stromales, progéniteurs CD34+, érythroblastes GpA+, lymphocytes CD3+) d'IL-11, d'IL-6 et d'hépatocyte growth factor (HGF) et du tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) chez les patients atteints de PV. Les taux sériques d'IL-11 et d'IL-6 ne corrélant pas avec le pourcentage de JAK2V617F mesuré dans les cellules des patients, nous pouvons penser que la dérégulation de leur production n'est a priori pas dictée par cette mutation. L'IL-11, par contre, corrèle avec l'hématocrite ce qui confirme l'importance de l'IL-11 dans l'érythropoïèse et son rôle dans la pathogénèse de la PV. Le taux sérique d'HGF, quant à lui, corrèle faiblement avec le pourcentage de JAK2V617F et avec le chiffre de neutrophiles et de leucocytes. Il est donc possible qu'il existe une relation entre l'augmentation de la production d'HGF et la mutation JAK2V617F dans les granulocytes. Il a été démontré que TIMP-1 est impliqué dans l'hématopoïèse, les progéniteurs hématopoïétiques expriment le récepteur de TIMP-1, il peut donc agir selon un mécanisme autocrine/paracrine (Lambert, Boudot et al. 2003). Dans cette même étude, il a été décrit que TIMP-1 possède un effet anti-apoptotique sur la lignée érythroïde UT-7 via les voies JAK2 et Pi3K/Akt. TIMP-1 stimule également la formation de BFU-E et potentialise les effets de l'Epo sur la différenciation érythroïde de la lignée érythroleucémique ELM-1-3. TIMP-1 est également capable de stimuler la croissance des fibroblastes (Lambert, Boudot et al. 2003).

Nous avons observé que les taux sériques d'HGF et de TIMP-1 sont corrélés dans la PV. Or, TIMP-1 se révèle être un régulateur négatif de la production d'HGF actif. En effet,

l'HGF est produit sous forme de pro-protéine inactive qui va se lier à la matrice extracellulaire et être libéré sous forme active après clivage par l'HGF activator (HGFA) et les métalloprotéinases de la matrice (MMP). TIMP-1 diminue le relargage d'HGF actif via son action inhibitrice sur les MMP (Mohammed, Pennington et al. 2005).

L'IL-11 et l'IL-6 partagent la même chaîne de transduction de signal : la gp130. La voie activée par la gp130 implique JAK1 et 2 et STAT1 et 3. Nous avons mis en évidence que les érythroblastes GpA⁺ de patients atteints de PV produisent de plus grandes quantités d'ARN messager de la gp130 et de STAT3 que les contrôles atteints de polyglobulie secondaire. Une étude sur des souris exprimant une forme hyperactive de gp130 portant la mutation Y757F ^{+/+} (knock-in) montre une hyperactivation de STAT1 et 3 associée à une splénomégalie et une thrombocytose. Les souris porteuses de la mutation gp130 Y757F ne sont plus capables de recruter SHP-1 et SOCS3, deux régulateurs négatifs des signaux induits par les cytokines de la famille gp130, ce qui a pour conséquence une suractivation de STAT1 et 3. Dans cette même étude, des expériences réalisées sur des souris gp130 Y757F ^{+/+} STAT3 ^{+/-} (knock-out hétérozygote pour STAT3) ont mis en évidence que c'est l'activation de STAT3 et non de STAT1 par les cytokines de la famille IL-6 qui est critique pour la régulation de la survie et de la prolifération des cellules hématopoïétiques. Les cellules hématopoïétiques présentent également une survie et une prolifération augmentée en réponse aux cytokines de la famille IL-6 chez les souris gp130 Y757F (Jenkins, Roberts et al. 2005). Enfin chez ces mêmes souris, l'ajout d'un phénotype knock-out pour l'IL-6 ou l'IL-11R α élimine la neutrophilie et la thrombocytose. De plus, l'absence d'IL-6 mais pas d'IL-11 prévient la splénomégalie et la lymphopoïèse anormale ainsi que l'hyperactivation de STAT3 dans les organes lymphoïdes des souris Y757F, l'hyperactivation de STAT3 ayant pour conséquence notamment l'augmentation de l'expression de l'IL-6R α à la surface des cellules. La myélopoïèse et la mégacaryopoïèse élevées chez les souris Y757F^{+/+} sont dues à l'IL-11 et l'IL-6 qui via STAT3 inhibent le signal du TGF β . En effet, le TGF β est un inhibiteur de ces mécanismes (Jenkins, Roberts et al. 2007). Une autre étude concernant des souris knock-out pour l'IL-11 R α a mis en évidence que ces animaux ne présentent pas de défaut de l'hématopoïèse et répondent normalement aux stress hématopoïétique (hypoxie). L'absence d'anomalies chez ces animaux met en évidence la redondance des facteurs hématopoïétiques (Nandurkar, Robb et al. 1998).

Au contraire, des études réalisées par ce même groupe avec des souris knock-out pour la gp130 ont mis en évidence des défauts de l'hématopoïèse avec la présence de CFU immatures

dans la moelle osseuse et la rate des souris ainsi qu'une augmentation des progéniteurs engagés dans la rate et le sang périphérique. Ceci étant accompagné d'une diminution des plaquettes circulantes et du nombre de précurseurs mégacaryocytaires dans la moelle osseuse (Jenkins, Quilici et al. 2002).

Ces résultats montrent que les voies médiées par la gp130 et les cytokines de la famille IL-6, en particulier l'IL-11 et l'IL-6, sont cruciales pour le bon déroulement de l'hématopoïèse et que leur dérégulation peut aboutir à un phénotype de syndrome myéloprolifératif.

Deux autres études avaient déjà mis en évidence la production d'HGF par les progéniteurs hématopoïétiques : CD34+ de la moelle osseuse et du sang périphérique, BFU-E, CFU-Meg ; et par les cellules stromales, au niveau protéique et ARN messager (Janowska-Wieczorek, Majka et al. 2001; Majka, Janowska-Wieczorek et al. 2001).

L'HGF, initialement décrit comme un facteur de croissance des hépatocytes, est également impliqué dans l'hématopoïèse. L'HGF est produits de manière constitutive par les cellules stromales de la moelle osseuse. Ces cellules expriment également cMet, le récepteur de l'HGF, celui-ci peut donc agir en boucle autocrine. De plus une étude réalisée avec des anticorps bloquants a montré que l'inhibition de l'HGF dans les cultures de cellules stromales diminue la capacité de celles-ci à stimuler la formation de colonies par les progéniteurs CD34+ et diminue également la production d'IL-11 par les cellules stromales (Matsuda-Hashii, Takai et al. 2004).

L'HGF, seul, n'est pas capable de stimuler l'hématopoïèse, il agit en synergie avec d'autres facteurs. L'HGF aide à la croissance des progéniteurs hématopoïétiques en synergie avec l'IL-3, le GM-CSF et l'Epo. L'HGF est un facteur de différenciation de la lignée mégacaryocytaire (Sugiura, Taketani et al. 2007). Il n'agit pas sur les progéniteurs CD34+, précoces, car ces derniers expriment cMet de façon variable, il est intéressant de noter que l'IL-11 stimule l'expression de cMet à la surface des progéniteurs CD34+ (Matsuda-Hashii, Takai et al. 2004). Ces résultats sont donc en accord avec la cascade hématopoïétique impliquant l'IL-11 et l'HGF que nous avons décrit dans l'article 6. Toujours dans l'étude de *Matsuda-Hashii et al. 2004*, après stimulation par le SCF, il a été observé une augmentation de l'expression de cMet à la surface des progéniteurs hématopoïétiques ainsi qu'une stimulation de la croissance des BFU-E en présence d'HGF.

Le récepteur spécifique de l'HGF, cMet, est un récepteur à domaine tyrosine kinase, présent uniquement chez les mammifères, il a pour seul adaptateur Gab1. La signalisation induite par la liaison de l'HGF sur son récepteur active, via Gab1, les voies Pi3K/Akt/PKB,

PLC, NFκB et STAT3 (Birchmeier, Birchmeier et al. 2003). Or, nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la quantité d'ARN messager d'IL-11, d'IL-6, d'HGF dans les érythroblastes de patients atteints de PV, ainsi qu'une corrélation positive de chacune de ces molécules avec les trois autres. Les résultats décrits jusqu'ici montrent que les voies IL-11/IL-6/gp130 et HGF/cMet, activent STAT3 et que ces molécules agissent toutes positivement sur la production les unes des autres ou sur l'expression de leurs récepteurs. Nous avons mis en évidence que ces voies sont dérégulées dans la PV. De plus, il est intéressant de noter qu'en cas d'hypoxie, il y a induction de l'expression de la voie HGF/cMet. En effet, l'hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1α) a pour cible le gène codant pour l'HGFA, ce qui a pour conséquence d'augmenter la quantité d'HGF actif, qui par action sur les fibroblastes va agir ensuite en boucle autocrine/paracrine pour entretenir sa propre production (Kitajima, Ide et al. 2008). L'augmentation de la production d'HGF est une réponse cellulaire classique en réponse à l'hypoxie. Ce mécanisme est maintenant établi dans certains cas congénitaux et familiaux de polyglobulies, ils sont alors dus à des mutations au niveau de gènes de la voie de la sensibilité à l'oxygène et notamment de l'HIF1 (Tacchini, Matteucci et al. 2003; Lee, Percy et al. 2006; Kitajima, Ide et al. 2008). Ces résultats sont en faveur d'un rôle physiologique de l'HGF dans la régulation de l'érythropoïèse.

Le récepteur de l'HGF, cMet, appartient à la famille des « récepteurs de dépendance ». Ces récepteurs induisent l'apoptose en absence de stimulation par leur ligand. L'apparition d'un déséquilibre entre le ligand et son récepteur conduisent à des anomalies de la survie cellulaire (Shinomiya, Gao et al. 2004; Bernet and Mehlen 2007). Dans les érythroblastes de PV, l'HGF est surpexprimé mais pas son récepteur, cMet. Or une sur-stimulation de cMet peut conduire à une suractivation de STAT3. Cette activation de STAT3 peut être accentuée par la production d'IL-11, d'IL-6 et via leur récepteur gp130, dérégulé dans la PV. Une des perspectives de notre projet est d'étudier les autres molécules impliquées dans ces voies de signalisation.

Nous avons, par ailleurs, mis en évidence une corrélation positive entre les taux d'ARN messager d'HGF, d'IL-11 et d'IL-6 avec STAT5, soulignant un lien entre la voie gp130 et cMet qui activent STAT3 et la voie EpoR/JAK2V617F/STAT5. Nous avons également trouvé une corrélation négative au niveau ARN messager entre cMet, STAT5, l'HGF, l'IL-11 et l'IL-6 avec JAK2 Total (forme sauvage + forme V617F) mais aucune corrélation avec la forme V617F, dans les érythroblastes de patients atteints de PV. L'ensemble de ces résultats indiquent donc qu'il existe dans la PV un mécanisme autocrine/paracrine de coopération entre les voies STAT5 et STAT3 médié par la gp130 et cMet et la production d'IL-11, d'IL-6 et

d'HGF, et que ce mécanisme, pro-érythropoïétique, semble être indépendant de la mutation JAK2V617F.

Une étude récente a mis en évidence une augmentation uniforme des formes phosphorylées de STAT5 et STAT3 (P-STAT5 et P-STAT3) par immuno-histochimie sur les biopsies ostéo-médullaires de patients atteints de PV (Teofili, Martini et al. 2007). Cette même étude a également montré une augmentation de P-STAT3 et une diminution de P-STAT5 chez les patients atteints de TE, ainsi qu'un profil de diminution uniforme de P-STAT5 et P-STAT3 chez les patients atteints de MFP. De plus, ces profils sont spécifiques d'un type de SMP et non du statut JAK2V617F. Enfin, comme il l'a été décrit dans l'introduction et dans les résultats, de nombreuses cytokines présentent une production dérégulée dans les SMP (Le Bousse-Kerdiles and Martyre 1999; Majka, Janowska-Wieczorek et al. 2001; Hermouet, Godard et al. 2002; Musolino, Calabro et al. 2002; Ho, Lasho et al. 2007) et ces cytokines sont différentes selon le SMP considéré.

Il semblerait donc que le profil d'expression cytokinique et des formes phosphorylées de STAT3 et STAT5 contribueraient à l'hématopoïèse anormale dans les SMP et ce indépendamment de la mutation JAK2V617F. L'indépendance de la surproduction d'HGF, d'IL-11, de gp130 et de STAT3, dans les érythroblastes de patients atteints de PV, vis-à-vis de JAK2V617F devra être confirmée expérimentalement.

En résumé, nous avons mis en évidence, chez les patients atteints de PV, l'activation au niveau de l'ARN messager des voies HGF/cMet et IL-11/gp130/STAT3. Ces modifications, dans l'équilibre des voies de signalisation, contribuent apparemment à l'expansion clonale des érythroblastes ainsi qu'à l'élévation de l'hématocrite.

Les résultats de cette étude ne permettent pas de déterminer les causes de la surstimulation de la voie IL-11/IL-6/STAT3 chez les patients atteints de PV. Ces causes peuvent être multiples, mais dépendent potentiellement d'une combinaison d'anomalies moléculaires et de stimulations extérieures par l'HGF et d'autres cytokines produites par les cellules stromales ou d'autres cellules du microenvironnement de la moelle osseuse (Figure 6).

Par ailleurs, l'expression de cMet au niveau ARN messager, en présence de taux élevés d'HGF, est élevée dans les érythroblastes de patients atteints de PV. Il semblerait que ce mécanisme contribue à la surstimulation chronique de la voie STAT3. Le gène codant pour cMet est situé sur le bras long du chromosome 7. Ce chromosome est fréquemment délété dans les pathologies myéloïdes, et muté dans les cancers. Il semble donc être une bonne cible d'étude en perspective de ce travail. Les gènes de la voie de la sensibilité à l'oxygène,

pouvant conduire à l'augmentation de la production d'HGF et les gènes codant pour les récepteurs spécifiques de l'IL-11 et de l'IL-6 ainsi que leur chaîne commune gp130 sont également des candidats potentiels.

Des études en cours, basées sur des transfections de cellules BaF3 par les formes sauvages et mutantes (V617F) de JAK2, devrait permettre de déterminer l'influence de la surexpression et l'activation de JAK2 sur le profil cytokinique, l'expression des récepteurs (cMet et gp130) à la surface des cellules et l'activation de STAT3.

Par ailleurs, des études de blocage, des récepteurs cMet, gp130, de l'activation de STAT3 et de la production d'HGF, d'IL11 et d'IL6, apporteront également des éléments de réponse concernant la place de chaque molécule dans la pathogène de la PV, ainsi qu'un intérêt thérapeutique comme il l'a été décrit dans le myélome multiple et d'autres pathologies myéloïdes (Du, Hattori et al. 2007; Sattler and Salgia 2007; Stellrecht, Phillip et al. 2007; Comoglio, Giordano et al. 2008).

Enfin, ce travail sera poursuivi dans le laboratoire par des études plus approfondies des récepteurs cMet et gp130, au niveau de l'ADN, de l'ARN messager et protéique, chez les patients atteints de PV.

Il est également prévu d'étudier les mécanismes de dérégulation de l'expression de cytokines dans les cellules myéloïdes, l'un des objectifs de mon stage de post-doctorat ;

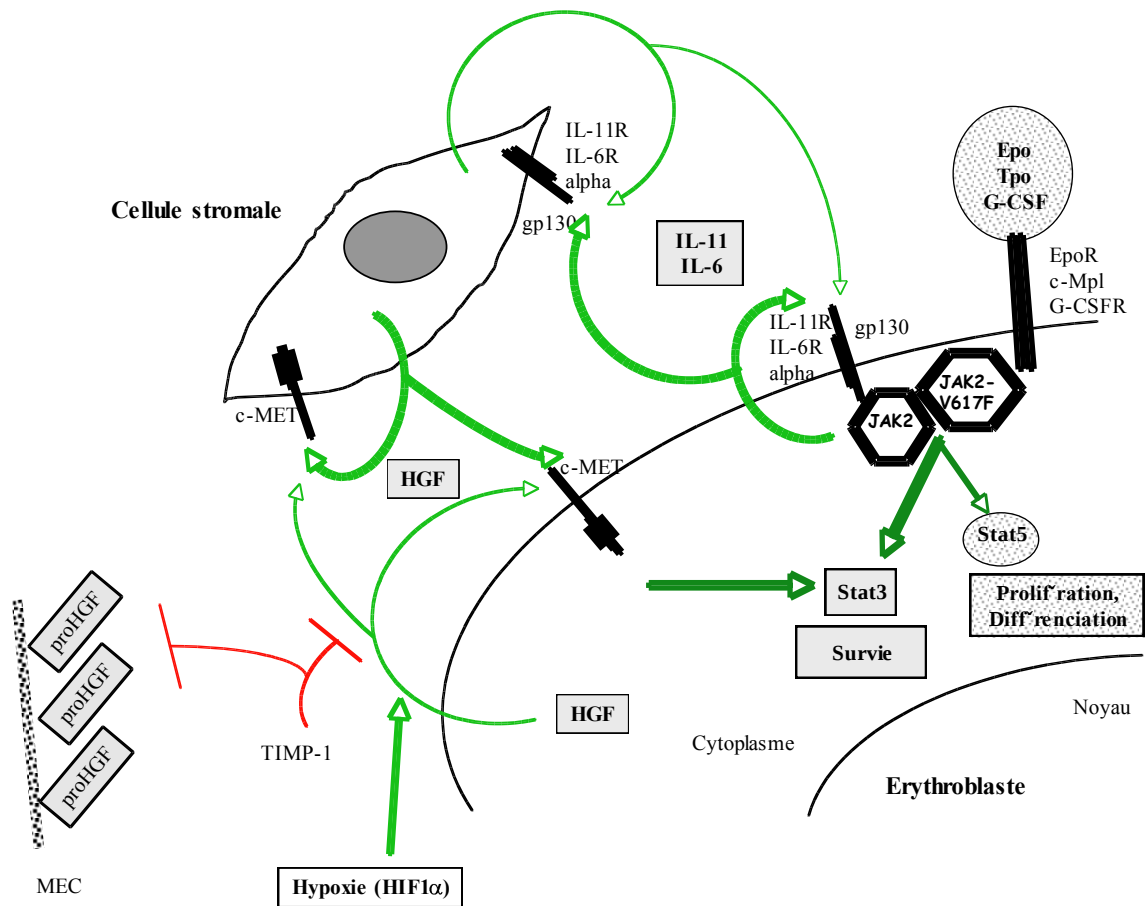


Figure 19: Modèle de production de cytokines et voies de signalisations impliquées dans l'hématopoïèse anormale dans la PV

BIBLIOGRAPHIE

- Ali, H., R. M. Richardson, et al. (1999). "Chemoattractant receptor cross-desensitization." The Journal of biological chemistry **274**(10): 6027-30.
- Anderson, D. M., S. D. Lyman, et al. (1990). "Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms." Cell **63**(1): 235-43.
- Bartley, T. D., J. Bogenberger, et al. (1994). "Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl." Cell **77**(7): 1117-24.
- Bauer, S., B. J. Kerr, et al. (2007). "The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury." Nature reviews. Neuroscience **8**(3): 221-32.
- Baxter, E. J., L. M. Scott, et al. "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders." Lancet **365**(9464): 1054-61.
- Bernet, A. s. and P. Mehlen (2007). "Dependence receptors: when apoptosis controls tumor progression." Bulletin Du Cancer **94**(4): E12-7 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17449433>.
- Birchmeier, C., W. Birchmeier, et al. (2003). "Met, metastasis, motility and more." Nature Reviews. Molecular Cell Biology **4**(12): 915-25.
- Bonilla, M. A., A. P. Gillio, et al. (1989). "Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia in patients with congenital agranulocytosis." The New England journal of medicine **320**(24): 1574-80.
- Breccia, M., S. G. Morano, et al. (2005). "Budd-Chiari syndrome as the first manifestation of polycythemia vera in young women with inherited thrombophilic state: an aggressive form of myeloproliferative disorder requiring multidisciplinary management." European journal of haematology **75**(5): 396-400.
- Broxmeyer, H. E., S. Cooper, et al. (1996). "Involvement of Interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue." The Journal of experimental medicine **184**(5): 1825-32.
- Campbell, P. J., M. Griesshammer, et al. (2006). "V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis." Blood **107**(5): 2098-100.
- Chong, Z. Z., J.-Q. Kang, et al. (2002). "Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades." Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism **22**(5): 503-14.
- Comoglio, P. M., S. Giordano, et al. (2008). "Drug development of MET inhibitors: targeting oncogene addiction and expedience." Nature Reviews. Drug Discovery **7**(6): 504-16 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511928>.
- Constantinescu, S. N., M. Girardot, et al. (2008). "Mining for JAK-STAT mutations in cancer." Trends in Biochemical Sciences **33**(3): 122-31.
- Corre, I., D. Pineau, et al. (1999). "Interleukin-8: an autocrine/paracrine growth factor for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factor-1 to promote monocyte-macrophage growth and differentiation." Experimental hematology **27**(1): 28-36.
- Dai, C. H., S. B. Krantz, et al. (1994). "Polycythaemia vera. III. Burst-forming units-erythroid (BFU-E) response to stem cell factor and c-kit receptor expression." British Journal of Haematology **86**(1): 12-21.
- Dale, D. C., M. A. Bonilla, et al. (1993). "A randomized controlled phase III trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (filgrastim) for treatment of severe chronic neutropenia." Blood **81**(10): 2496-502.

- Dameshek, W. (1951). "Some speculations on the myeloproliferative syndromes." Blood **6**(4): 372-5.
- de Sauvage, F. J., P. E. Hass, et al. (1994). "Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand." Nature **369**(6481): 533-8.
- Denizot, Y., P. Fixe, et al. (1996). "Serum interleukin-8 (IL-8) and IL-6 concentrations in patients with hematologic malignancies." Blood **87**(9): 4016-7.
- Dittrich, E., C. R. Haft, et al. (1996). "A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor." The Journal of biological chemistry **271**(10): 5487-94.
- Du, W., Y. Hattori, et al. (2007). "NK4, an antagonist of hepatocyte growth factor (HGF), inhibits growth of multiple myeloma cells: molecular targeting of angiogenic growth factor." Blood **109**(7): 3042-9 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17179234>.
- Du, X. and D. A. Williams (1997). "Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use." Blood **89**(11): 3897-908.
- Emadi, S., D. Clay, et al. (2005). "IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis." Blood **105**(2): 464-73.
- Feese, M. D., T. Tamada, et al. (2004). "Structure of the receptor-binding domain of human thrombopoietin determined by complexation with a neutralizing antibody fragment." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(7): 1816-21.
- Fernandez-Botran, R., P. M. Chilton, et al. (1996). "Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy." Advances in immunology **63**: 269-336.
- Flex, E., V. Petrangeli, et al. (2008). "Somatically acquired JAK1 mutations in adult acute lymphoblastic leukemia." The Journal of Experimental Medicine **205**(4): 751-8 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18362173>.
- Gaikwad, A., R. Nussenzveig, et al. (2007). "In vitro expansion of erythroid progenitors from polycythemia vera patients leads to decrease in JAK2 V617F allele." Experimental Hematology **35**(4): 587-95.
- Gaillard, J. P., J. Liautard, et al. (1997). "Major role of the soluble interleukin-6/interleukin-6 receptor complex for the proliferation of interleukin-6-dependent human myeloma cell lines." European journal of immunology **27**(12): 3332-40.
- Gommerman, J. L., D. Sittaro, et al. (2000). "Differential stimulation of c-Kit mutants by membrane-bound and soluble Steel Factor correlates with leukemic potential." Blood **96**(12): 3734-42.
- Grebien, F., M. A. Kerenyi, et al. (2008). "Stat5 activation enables erythropoiesis in the absence of EpoR and Jak2." Blood **111**(9): 4511-22.
- Harrison, C. N., R. E. Gale, et al. (1999). "A large proportion of patients with a diagnosis of essential thrombocythemia do not have a clonal disorder and may be at lower risk of thrombotic complications." Blood **93**(2): 417-24.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." The Biochemical journal **374**(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." The Biochemical journal **334** (Pt 2): 297-314.
- Hermouet, S., I. Corre, et al. (2000). "Interleukin-8 and other agonists of Gi2 proteins: autocrine paracrine growth factors for human hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factors." Leukemia & lymphoma **38**(1-2): 39-48.
- Hermouet, S., A. Godard, et al. (2002). "Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythaemia vera." Cytokine **20**(4): 178-83.

- Hexner, E. O., C. Serdikoff, et al. (2007). "Lestaurtinib (CEP701) is a JAK2 inhibitor that suppresses JAK2/STAT5 signaling and the proliferation of primary erythroid cells from patients with myeloproliferative disorders." Blood.
- Ho, C.-L., T. L. Lasho, et al. (2007). "Global cytokine analysis in myeloproliferative disorders." Leukemia Research **31**(10): 1389-92.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, et al. (2002). "Multiple control of interleukin-8 gene expression." Journal of leukocyte biology **72**(5): 847-55.
- Holtmann, H., J. Enninga, et al. (2001). "The MAPK kinase kinase TAK1 plays a central role in coupling the interleukin-1 receptor to both transcriptional and RNA-targeted mechanisms of gene regulation." The Journal of biological chemistry **276**(5): 3508-16.
- Hookham, M. B., J. Elliott, et al. (2007). "The myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant escapes negative regulation by suppressor of cytokine signaling 3." Blood **109**(11): 4924-9.
- Horiuchi, S., Y. Koyanagi, et al. (1994). "Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism." European journal of immunology **24**(8): 1945-8.
- Horuk, R. (1994). "The interleukin-8-receptor family: from chemokines to malaria." Immunology today **15**(4): 169-74.
- Huang, L. J., S. N. Constantinescu, et al. (2001). "The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor." Molecular cell **8**(6): 1327-38.
- Ishii, T., E. Bruno, et al. (2006). "Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera." Blood **108**(9): 3128-34.
- Ishii, T., Y. Zhao, et al. (2007). "T cells from patients with polycythemia vera elaborate growth factors which contribute to endogenous erythroid and megakaryocyte colony formation." Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **21**(12): 2433-41.
- Jakubowski, A. A., L. Souza, et al. (1989). "Effects of human granulocyte colony-stimulating factor in a patient with idiopathic neutropenia." The New England journal of medicine **320**(1): 38-42.
- James, C., V. r. Ugo, et al. (2005). "A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera." Nature **434**(7037): 1144-8.
- Janowska-Wieczorek, A., M. Majka, et al. (2001). "Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis." Stem Cells (Dayton, Ohio) **19**(2): 99-107.
- Jelinek, J., Y. Oki, et al. (2005). "JAK2 mutation 1849G>T is rare in acute leukemias but can be found in CMML, Philadelphia chromosome-negative CML, and megakaryocytic leukemia." Blood **106**(10): 3370-3.
- Jelkmann, W., J. Bohlius, et al. (2008). "The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues." Critical reviews in oncology/hematology.
- Jenkins, B. J., C. Quilici, et al. (2002). "Hematopoietic abnormalities in mice deficient in gp130-mediated STAT signaling." Experimental Hematology **30**(11): 1248-56.
- Jenkins, B. J., A. W. Roberts, et al. (2007). "Pathologic consequences of STAT3 hyperactivation by IL-6 and IL-11 during hematopoiesis and lymphopoiesis." Blood **109**(6): 2380-8.
- Jenkins, B. J., A. W. Roberts, et al. (2005). "The threshold of gp130-dependent STAT3 signaling is critical for normal regulation of hematopoiesis." Blood **105**(9): 3512-20.
- Kato, T., K. Ogami, et al. (1995). "Purification and characterization of thrombopoietin." Journal of biochemistry **118**(1): 229-36.

- Kelemen, E., I. Cserhati, et al. (1958). "Demonstration and some properties of human thrombopoietin in thrombocythaemic sera." Acta haematologica **20**(6): 350-5.
- Khandaker, M. H., G. Mitchell, et al. (1999). "Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression." Blood **93**(7): 2173-85.
- Kiladjian, J.-J., B. Cassinat, et al. (2006). "High molecular response rate of polycythemia vera patients treated with pegylated interferon alpha-2a." Blood **108**(6): 2037-40.
- Kiladjian, J.-J., F. Cervantes, et al. (2008). "The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases." Blood **111**(10): 4922-9.
- Kirito, K., T. Watanabe, et al. (2002). "Thrombopoietin regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways." The Journal of biological chemistry **277**(10): 8329-37.
- Kishimoto, T. (1989). "The biology of interleukin-6." Blood **74**(1): 1-10.
- Kitajima, Y., T. Ide, et al. (2008). "Induction of hepatocyte growth factor activator gene expression under hypoxia activates the hepatocyte growth factor/c-Met system via hypoxia inducible factor-1 in pancreatic cancer." Cancer Science **99**(7): 1341-7.
- Knoops, L., T. Hornakova, et al. (2008). "JAK kinases overexpression promotes in vitro cell transformation." Oncogene **27**(11): 1511-9.
- Kobayashi, S., M. Teramura, et al. (1993). "Circulating megakaryocyte progenitors in myeloproliferative disorders are hypersensitive to interleukin-3." British Journal of Haematology **83**(4): 539-44.
- Kralovics, R., Y. Guan, et al. (2002). "Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera." Experimental hematology **30**(3): 229-36.
- Kralovics, R., F. Passamonti, et al. (2005). "A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders." The New England journal of medicine **352**(17): 1779-90.
- Kralovics, R., S.-S. Teo, et al. (2006). "Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders." Blood **108**(4): 1377-80.
- Kuter, D. J. and R. D. Rosenberg (1994). "Appearance of a megakaryocyte growth-promoting activity, megapoietin, during acute thrombocytopenia in the rabbit." Blood **84**(5): 1464-72.
- Lacombe, C. and P. Mayeux (1998). "Biology of erythropoietin." Haematologica **83**(8): 724-32.
- Lacout, C., D. F. Pisani, et al. (2006). "JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis." Blood **108**(5): 1652-60.
- Lambert, E., C. d. Boudot, et al. (2003). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 signalling pathway leading to erythroid cell survival." The Biochemical Journal **372**(Pt 3): 767-74.
- Larsen, T. S., J. H. Christensen, et al. (2007). "The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders." British Journal of Haematology **136**(5): 745-51.
- Le Bousse-Kerdiles, M. C. and M. C. Martyre (1999). "Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis." Annals of hematology **78**(10): 437-44.

- Lee, F. S., M. J. Percy, et al. (2006). "Oxygen sensing: recent insights from idiopathic erythrocytosis." Cell Cycle (Georgetown, Tex.) **5**(9): 941-5 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687917>.
- Levine, R. L., M. Loriaux, et al. (2005). "The JAK2V617F activating mutation occurs in chronic myelomonocytic leukemia and acute myeloid leukemia, but not in acute lymphoblastic leukemia or chronic lymphocytic leukemia." Blood **106**(10): 3377-9.
- Levine, R. L., M. Wadleigh, et al. (2005). "Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis." Cancer cell **7**(4): 387-97.
- Li, A., S. Dubey, et al. (2002). "Interleukin-8-induced proliferation, survival, and MMP production in CXCR1 and CXCR2 expressing human umbilical vein endothelial cells." Microvascular research **64**(3): 476-81.
- Li, S., R. Kralovics, et al. (2008). "Clonal heterogeneity in polycythemia vera patients with JAK2 exon12 and JAK2-V617F mutations." Blood **111**(7): 3863-6.
- Lippert, E., M. Boissinot, et al. (2006). "The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera." Blood **108**(6): 1865-7.
- Liu, E., J. Jelinek, et al. (2003). "Discrimination of polycythemias and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin." Blood **101**(8): 3294-301.
- Lok, S., K. Kaushansky, et al. (1994). "Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo." Nature **369**(6481): 565-8.
- Lu, X., L. J.-S. Huang, et al. (2008). "Dimerization by a cytokine receptor is necessary for constitutive activation of JAK2V617F." The Journal of biological chemistry **283**(9): 5258-66.
- Mahboubi, K., B. C. Biedermann, et al. (2000). "IL-11 activates human endothelial cells to resist immune-mediated injury." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **164**(7): 3837-46.
- Majka, M., A. Janowska-Wieczorek, et al. (2001). "Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner." Blood **97**(10): 3075-85.
- Majka, M., J. Ratajczak, et al. (2002). "Thrombopoietin, but not cytokines binding to gp130 protein-coupled receptors, activates MAPKp42/44, AKT, and STAT proteins in normal human CD34+ cells, megakaryocytes, and platelets." Experimental hematology **30**(7): 751-60.
- Martyré, M. C., M. C. Le Bousse-Kerdiles, et al. (1997). "Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis." British journal of haematology **97**(2): 441-8.
- Matsuda-Hashii, Y., K. Takai, et al. (2004). "Hepatocyte growth factor plays roles in the induction and autocrine maintenance of bone marrow stromal cell IL-11, SDF-1 alpha, and stem cell factor." Experimental Hematology **32**(10): 955-61.
- Matsui, J., T. Wakabayashi, et al. (2004). "Stem cell factor/c-kit signaling promotes the survival, migration, and capillary tube formation of human umbilical vein endothelial cells." The Journal of biological chemistry **279**(18): 18600-7.
- Maxwell, P. J., R. Gallagher, et al. (2007). "HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells." Oncogene **26**(52): 7333-45.

- Mohammed, F. F., C. J. Pennington, et al. (2005). "Metalloproteinase inhibitor TIMP-1 affects hepatocyte cell cycle via HGF activation in murine liver regeneration." Hepatology (Baltimore, Md.) **41**(4): 857-67.
- Molitero, A. R., W. D. Hankins, et al. (1998). "Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera." The New England journal of medicine **338**(9): 572-80.
- Molitero, A. R., D. M. Williams, et al. (2006). "Molecular mimicry in the chronic myeloproliferative disorders: reciprocity between quantitative JAK2 V617F and Mpl expression." Blood **108**(12): 3913-5.
- Müllberg, J., H. Schooltink, et al. (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." European journal of immunology **23**(2): 473-80.
- Müller-Newen, G., A. Küster, et al. (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950) **161**(11): 6347-55.
- Musolino, C., L. Calabro, et al. (2002). "Soluble angiogenic factors: implications for chronic myeloproliferative disorders." American journal of hematology **69**(3): 159-63.
- Nandurkar, H. H., L. Robb, et al. (1998). "The role of IL-II in hematopoiesis as revealed by a targeted mutation of its receptor." Stem Cells (Dayton, Ohio) **16 Suppl 2**: 53-65.
- Nussenzweig, R. H., S. I. Swierczek, et al. (2007). "Polycythemia vera is not initiated by JAK2V617F mutation." Experimental Hematology **35**(1): 32-8.
- Osler, W. (1903). "Chronic cyanosis with polycythemia and enlarged spleen: a new clinical entity." Am J Med Sci **126**: 187-201 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Osler, W. (1908). "A clinical lecture on erythraemia (polycythaemia with cyanosis, maladie de Vaquez)." Lancet **1**: 143-146 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.
- Panopoulos, A. D. and S. S. Watowich (2008). "Granulocyte colony-stimulating factor: Molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis." Cytokine.
- Pardanani, A., T. L. Lasho, et al. (2007). "JAK2V617F prevalence and allele burden in non-splanchic venous thrombosis in the absence of overt myeloproliferative disorder." Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **21**(8): 1828-9.
- Pasqualucci, L., S. Li, et al. (2008). "NPM1-mutated acute myeloid leukaemia occurring in JAK2-V617F+ primary myelofibrosis: de-novo origin?" Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.
- Patel, R. K., N. C. Lea, et al. (2006). "Prevalence of the activating JAK2 tyrosine kinase mutation V617F in the Budd-Chiari syndrome." Gastroenterology **130**(7): 2031-8.
- Percy, M. J., L. M. Scott, et al. (2007). "The frequency of JAK2 exon 12 mutations in idiopathic erythrocytosis patients with low serum erythropoietin levels." Haematologica **92**(12): 1607-14.
- Peters, M., S. Jacobs, et al. (1996). "The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6." The Journal of experimental medicine **183**(4): 1399-406.
- Peters, M., P. Schirmacher, et al. (1997). "Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice." The Journal of experimental medicine **185**(4): 755-66.
- Pietra, D., S. Li, et al. (2008). "Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders." Blood **111**(3): 1686-9.

- Plo, I., M. Nakatake, et al. (2008). "JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability : potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders." Blood.
- Ratajczak, J., J. Kijowski, et al. (2003). "Biological significance of the different erythropoietic factors secreted by normal human early erythroid cells." Leukemia & lymphoma **44**(5): 767-74.
- Ribatti, D., M. Presta, et al. (1999). "Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo." Blood **93**(8): 2627-36.
- Richardson, R. M., B. C. Pridgen, et al. (1998). "Differential cross-regulation of the human chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. Evidence for time-dependent signal generation." The Journal of biological chemistry **273**(37): 23830-6.
- Rodriguez, C., J. Grosgeorge, et al. (1995). "Human gp130 transducer chain gene (IL6ST) is localized to chromosome band 5q11 and possesses a pseudogene on chromosome band 17p11." Cytogenetics and cell genetics **70**(1-2): 64-7.
- Roskoski, R. (2005). "Structure and regulation of Kit protein-tyrosine kinase--the stem cell factor receptor." Biochemical and biophysical research communications **338**(3): 1307-15.
- Sattler, M. and R. Salgia (2007). "c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy." Current Oncology Reports **9**(2): 102-8 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17288874>.
- Schmitt-Graeff, A. H., S.-S. Teo, et al. (2008). "JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis." Haematologica **93**(1): 34-40.
- Scott, L. M., W. Tong, et al. (2007). "JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis." The New England journal of medicine **356**(5): 459-68.
- Shinomiya, N., C. F. Gao, et al. (2004). "RNA interference reveals that ligand-independent met activity is required for tumor cell signaling and survival." Cancer Research **64**(21): 7962-70 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15520203>.
- Shivakrupa, R. and D. Linnekin (2005). "Lyn contributes to regulation of multiple Kit-dependent signaling pathways in murine bone marrow mast cells." Cellular signalling **17**(1): 103-9.
- Skoda, R. (2007). "The Genetic Basis of Myeloproliferative Disorders." Hematology **2007**(1): 1-10 %U <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/cgi/content/abstract/bloodbook;2007/1/1>.
- Solberg, L. A. (2002). "Therapeutic options for essential thrombocythemia and polycythemia vera." Seminars in oncology **29**(3 Suppl 10): 10-5.
- Spivak, J. L. (2007). "Phenotype and genotype in the myeloproliferative disorders." European journal of haematology. Supplementum(68): 9-12.
- Steensma, D. P., G. W. Dewald, et al. (2005). "The JAK2 V617F activating tyrosine kinase mutation is an infrequent event in both "atypical" myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes." Blood **106**(4): 1207-9.
- Stellrecht, C. M., C. J. Phillip, et al. (2007). "Multiple myeloma cell killing by depletion of the MET receptor tyrosine kinase." Cancer Research **67**(20): 9913-20 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942923>.
- Sugiura, K., S. Taketani, et al. (2007). "Effect of hepatocyte growth factor on long term hematopoiesis of human progenitor cells in transgenic-severe combined immunodeficiency mice." Cytokine **37**(3): 218-26.

- Szpurka, H., R. Tiu, et al. (2006). "Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation." Blood **108**(7): 2173-81.
- Tacchini, L., E. Matteucci, et al. (2003). "Hepatocyte growth factor signaling regulates transactivation of genes belonging to the plasminogen activation system via hypoxia inducible factor-1." Experimental Cell Research **290**(2): 391-401 %U <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14567996>.
- Takai, K., J. Hara, et al. (1997). "Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis." Blood **89**(5): 1560-5.
- Tefferi, A., T. L. Lasho, et al. (2005). "The JAK2(V617F) tyrosine kinase mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: lineage specificity and clinical correlates." British journal of haematology **131**(3): 320-8.
- Tefferi, A., T. L. Lasho, et al. (2006). "The clinical phenotype of wild-type, heterozygous, and homozygous JAK2V617F in polycythemia vera." Cancer **106**(3): 631-5.
- Tenhumberg, S., B. r. Schuster, et al. (2006). "gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes." Biochemical and biophysical research communications **346**(3): 649-57.
- Teofili, L., M. Martini, et al. (2007). "Different STAT-3 and STAT-5 phosphorylation discriminates among Ph-negative chronic myeloproliferative diseases and is independent of the V617F JAK-2 mutation." Blood **110**(1): 354-9.
- Tiedt, R., H. Hao-Shen, et al. (2008). "Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice." Blood **111**(8): 3931-40.
- Timmermann, A., S. Pflanz, et al. (2000). "Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor." FEBS letters **468**(2-3): 120-4.
- Vannucchi, A. M., E. Antonioli, et al. (2007). "Clinical profile of homozygous JAK2 617V>F mutation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia." Blood **110**(3): 840-6.
- Vaquez, L. H. (1892). "Sur une forme sp^v©ciale de cyanose s'accompagnant d'hyperglobulie exccesive et persistante." CR Soc Biol (Paris) **44**: 384-388 %U http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=Vaquez%20H&sourceid=mozilla-search&db=pubmed&orig_db=PubMed&dispmax=20&dopt=DocSum.
- Vicente, C., I. Vazquez, et al. (2007). "JAK2-V617F activating mutation in acute myeloid leukemia: prognostic impact and association with other molecular markers." Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K **21**(11): 2386-90.
- Wernig, G., T. Mercher, et al. (2006). "Expression of Jak2V617F causes a polycythemia vera-like disease with associated myelofibrosis in a murine bone marrow transplant model." Blood **107**(11): 4274-81.
- Wickrema, A., F. Chen, et al. (1999). "Defective expression of the SHP-1 phosphatase in polycythemia vera." Experimental Hematology **27**(7): 1124-32.
- Xing, S., T. H. Wanting, et al. (2008). "Transgenic expression of JAK2V617F causes myeloproliferative disorders in mice." Blood **111**(10): 5109-17.
- Xu, M., E. Bruno, et al. (2005). "The constitutive mobilization of bone marrow-repopulating cells into the peripheral blood in idiopathic myelofibrosis." Blood **105**(4): 1699-705.
- Zwezdaryk, K. J., S. B. Coffelt, et al. (2007). "Erythropoietin, a hypoxia-regulated factor, elicits a pro-angiogenic program in human mesenchymal stem cells." Experimental hematology **35**(4): 640-52.

RÉSUMÉ

SYNDROME MYELOPROLIFERATIF, POLYGLOBULIE DE VAQUEZ, ERYTHROBLASTES, JAK2V617F, IL-11, IL-6, STAT3, STAT5, RECEPTEURS, RTQPCR

La polyglobulie de Vaquez (PV) appartient à la famille des syndromes myéloprolifératifs (SMP). C'est une maladie clonale dont l'origine se situe au niveau d'un progéniteur multipotent. En 2005, la description de la mutation JAK2V617F et sa présence dans 95% des cas de PV, à la fois à l'état homozygote et hétérozygote, a été le point de départ de nouvelles interrogations concernant les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de cette maladie. L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, de mettre au point une technique sensible de PCR quantitative spécifique d'allèle. Cette technique a permis d'étudier le niveau d'expression de JAK2V617F chez les patients au diagnostic de SMP. Nous avons, ensuite, utilisé cette même approche pour étudier l'importance de la détection de JAK2V617F pour la détection de SMP latent dans les présentations atypiques comme les thromboses digestives profondes et les anémies réfractaires sidéroblastiques. Nous avons également, en collaboration, déterminé que quand un SMP positif pour JAK2V617F se transforme en leucémie aigue myéloïde, celle-ci est fréquemment négative pour la mutation. Il a également été mis en évidence que les clones JAK2V617F positifs et négatifs peuvent se développer à partir d'un ancêtre commun. Enfin, nous avons décrit dans la PV, la dérégulation de la production, au niveau protéique et ARN messenger, de plusieurs cytokines hématopoïétiques et de leur voie de signalisation (IL-11, IL-6, gp130, JAK2, STAT3). Cette dérégulation participe à l'hématopoïèse anormale dans la PV. Ces mécanismes, indépendants de JAK2V617F, semblent maintenir l'équilibre entre les voies JAK2V617F/STAT5 et JAK2/STAT3.

ABSTRACT

Myeloproliferative disorder, Polycythemia Vera, erythroblasts, JAK2V617F, IL-11, IL-6, STAT3, STAT5, receptors, RTqPCR.

Polycythemia Vera (PV) belongs to the family of myeloproliferative disorders (MPD). It is a clonal disease arising from a multipotent progenitor. In 2005, the JAK2V617F mutation was discovered as a MPD specific mutation present in more than 95% of PV patients both at homozygous and heterozygous state. This discovery was the starting point of a new area in the understanding of molecular mechanisms involved in MPD pathogenesis. The aim of our work was, first to set up an assay of allele specific quantitative PCR. Thanks to this assay, we were able to study the importance of JAK2V617F mutation at diagnosis of MPD. We also used this assay to investigate the relevance of JAK2V617F detection for the diagnosis of latent MPD in atypical presentations like splanchnic vein thrombosis and refractory anemia with ringed sideroblasts. In addition, in collaboration, we have determined that positive JAK2V617F MPD often transform into JAK2V617F negative acute myeloid leukemia, and that both clones may derive from the same JAK2V617F negative ancestral clone. Finally, we have described, in PV patients, elevated production of hematopoietic cytokines (IL-11, IL-6), both at the protein and messenger RNA level. Their signaling pathway (gp130, JAK2, STAT3) was also dysregulated and this pathway is involved in PV abnormal hematopoiesis. This mechanism is independent from JAK2V617F and seems to maintain the balance between the JAK2V617F/STAT5 and JAK2/STAT3 pathways.